



**Università degli Studi di Padova**

**Facoltà di Medicina Veterinaria**

Corso di Laurea in Medicina Veterinaria

**TESI DI LAUREA**

IMPIEGO DEL DESAMETASONE COME PROMOTORE DI  
CRESCITA NEL BOVINO: STUDIO DELL'ESCREZIONE URINARIA

Relatore: Prof.ssa Francesca Capolongo

Correlatore: Dott. Guglielmo Gallina

Laureanda: Silvia Versolatto

N° Matricola: 461182 /MV

**Anno Accademico 2010/2011**



## **INDICE**

<b>1.</b>	<b>INTRODUZIONE</b>	<b>1</b>
1.1	I corticosteroidi	2
1.2	Impiego illecito del desametasone	7
1.3	Legislazione vigente	10
1.4	Individuazione dei trattamenti illeciti	12
<b>2.</b>	<b>SCOPO DELLA TESI</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALI E METODI</b>	<b>17</b>
3.1	Soggetti della sperimentazione	17
3.2	Raccolta dei campioni di urina	17
3.3	Analisi delle urine mediante LC-MS/MS/MS	18
3.3.1	Reagenti e solventi	18
3.3.2	Preparazione delle soluzioni standard	18
3.3.3	Preparazione del campione	19
3.3.4	Preparazione della retta di calibrazione	22
3.3.5	Cromatografia liquida	22
3.3.6	Spettrometria di massa	23
3.4	Validazione del metodo	25
3.5	Analisi statistica	28
<b>4.</b>	<b>RISULTATI E DISCUSSIONE</b>	<b>29</b>
4.1	Sviluppo e validazione del metodo	29
4.2	Risultati del piano sperimentale	36
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONI</b>	<b>46</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>48</b>



## 1. INTRODUZIONE

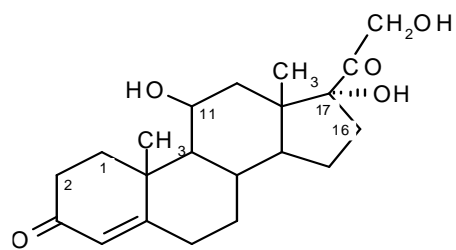
Il desametasone (9 $\alpha$ -fluoro-16 $\alpha$ -metilprednisolone) è un derivato sintetico del cortisolo molto utilizzato in Medicina Veterinaria appartenente alla famiglia dei corticosteroidi, ormoni a struttura steroidea prodotti dalla corticale delle ghiandole surrenali, deputati al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo (Ferguson *et al.*, 1999). Si dividono in glicocorticoidi, che svolgono azione antiinfiammatoria, antiallergica e intervengono nel metabolismo di carboidrati, lipidi e proteine e mineralcorticoidi, importanti per l'equilibrio idro-elettrolitico.

Le molecole di interesse ai fini della presente trattazione appartengono al gruppo dei glicocorticoidi di sintesi che derivano dal cortisolo o idrocortisone endogeno, sintetizzato a partire dal colesterolo sotto stimolazione dell'ormone adrenocorticotropo (ACTH) (Debenedetti, 2006). L'ACTH, prodotto dalle cellule basofile dell'adenoipofisi, interagisce con il proprio recettore sulla membrana plasmatica delle cellule surrenali stimolando l'attività dell'adenilato ciclasi e aumentando sia la velocità di sintesi sia la concentrazione dell'AMP ciclico. L'ACTH, quindi, mediante la fosforilazione cAMP dipendente, stimola la captazione del colesterolo dalle lipoproteine plasmatiche e ne favorisce la traslocazione dal citosol attraverso la membrana mitocondriale. La tappa limitante del processo di sintesi è rappresentata dalla scissione ossidativa della catena laterale del colesterolo, reazione che porta alla formazione del pregnenolone (Schimmer *et al.*, 2001). La secrezione di ACTH è, a sua volta, controllata da un fattore di regolazione prodotto dall'ipotalamo (CRH) e, in parte, dalla vasopressina (ADH) che potenzia l'effetto del CRH. I tre organi coinvolti nel processo di sintesi del cortisolo costituiscono, nell'insieme, l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA).

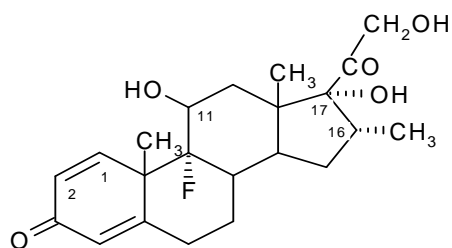
## 1.1 I CORTICOSTEROIDI

I composti di sintesi (Figura 1) sono caratterizzati da modificazioni della struttura del cortisolo e ciò fa sì che essi acquisiscano proprietà favorevoli ai fini del loro uso farmacologico. Il desametasone si caratterizza per una azione più duratura ed è circa trenta volte più potente rispetto al cortisolo mentre il suo potere mineralcorticoide è quasi nullo (Ferguson *et al.*, 1999). In generale, le modificazioni strutturali che determinano la comparsa di caratteristiche favorevoli per l'impiego farmacologico sono: la presenza di un doppio legame tra C1 e C2, l'alogenazione in C9 (con un atomo di fluoro o cloro) e la metilazione in C16. Infatti, l'alogenazione e la metilazione determinano, insieme, un'aumentata capacità di legame con le proteine sieriche prolungando considerevolmente l'emivita plasmatica e, quindi, la durata dell'azione farmacologica (Nebbia, 2009). Quest'ultima dipende, anche, dal rapporto tra idrosolubilità e liposolubilità del composto: l'esterificazione in C21 con radicali diversi influenza il rilascio della base dal sito di inoculo ad opera di esterasi tissutali. La durata d'azione dei farmaci può essere prolungata fino a tempi superiori alle 48 ore, come nel caso di alcune preparazioni di desametasone, betametasone e flumetasone, che sono tra i principi attivi più potenti e maggiormente impiegati nella clinica veterinaria (Badino *et al.*, 2009).

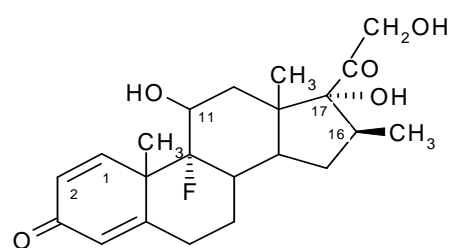
Il loro meccanismo di azione si esplica, come per la maggior parte degli ormoni steroidei, mediante l'interazione con recettori specifici presenti nel citoplasma delle cellule bersaglio; il complesso ormone-recettore viene trasportato all'interno del nucleo dove regola l'espressione genica attraverso l'interazione con i Glucocorticoidi Response Elements (GREs) (Ferguson *et al.*, 1999) (Figura 2).



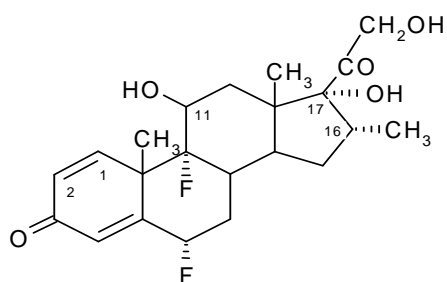
Cortisolo



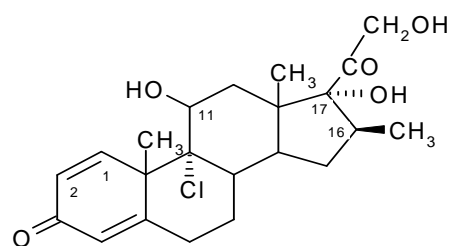
Desametasone



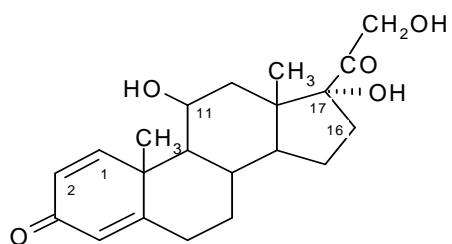
Betametasone



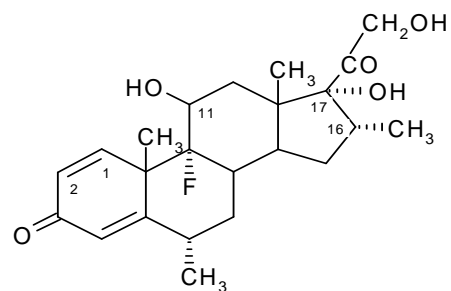
Flumetasone



Beclometasone



Prednisolone



Fluorometolone

Figura 1: Struttura chimica del cortisolo e dei principali corticosteroidi di sintesi.

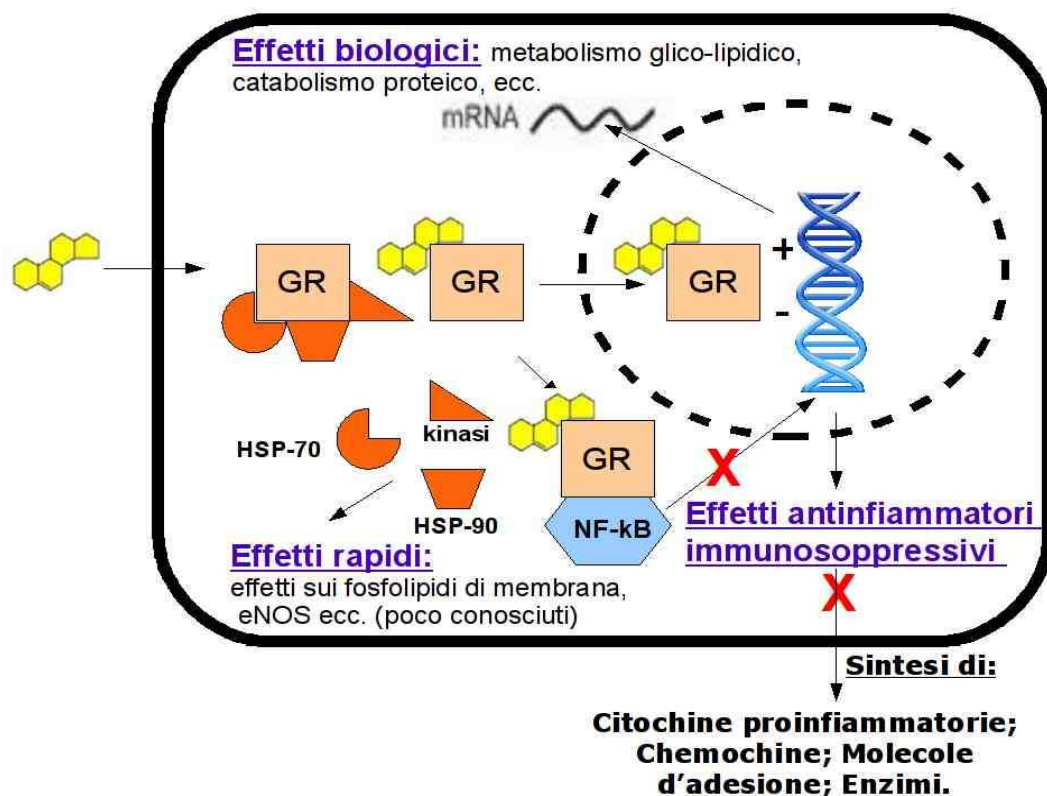


Figura 2: Meccanismo d'azione ed effetti dei glicocorticoidi.

Le indicazioni terapeutiche dei glicocorticoidi sono molteplici e comprendono numerose patologie sia metaboliche che infiammatorie, tanto nei piccoli quanto nei grandi animali. Esercitano una vasta gamma di effetti fisiologici che concorrono al mantenimento dell'omeostasi dell'organismo: partecipano al metabolismo intermedio dei carboidrati, proteine e lipidi; regolano il bilancio idrico ed elettrolitico e svolgono una potente azione antiinfiammatoria e immunosoppressiva (Courtheyn *et al.*, 2002).

La più importante azione farmacologica che tali molecole svolgono è senza dubbio quella antiflogistica. Essa si realizza con meccanismi diversi ed è efficace sia nella fase acuta (essudativa) sia in quella tardiva (con funzione riparativa). La soppressione della risposta infiammatoria avviene mediante diverse vie: i glicocorticoidi riducono il numero di linfociti ed eosinofili circolanti; inibiscono il rilascio di acido arachidonico da parte delle fosfolipasi A2 a livello della



membrana cellulare limitando, di conseguenza, la formazione di prostaglandine, leucotrieni e PAF; deprimono, inoltre, la sintesi di anticorpi e interferone (Ferguson *et al.*, 1999). Agiscono anche a livello cardiovascolare determinando un aumento della forza di contrazione cardiaca, della pressione sanguigna e della perfusione tissutale (Greco *et al.*, 2002) mentre sul SNC sono in grado di aumentare l'eccitabilità neuronale producendo una condizione di euforia che si traduce in uno stato di generale benessere (Debenedetti, 2006).

I cortisonici esercitano la loro azione anche sull'equilibrio idro-elettrolitico causando: ritenzione di  $\text{Na}^+$  ed eliminazione di  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ , ritenzione idrica, aumento del volume dei liquidi extracellulari e aumento dell'eliminazione del  $\text{Ca}^{2+}$  se somministrati per tempi prolungati (Nebbia, 2009). A causa dell'incremento dei livelli plasmatici di sodio, in seguito a trattamenti con glicocorticoidi si può evidenziare la comparsa di polidipsia (PD), spesso accompagnata da poliuria (PU).

Gli effetti antiinfiammatori e quelli sull'equilibrio idro-elettrolitico sono di intensità diversa in rapporto alla natura delle molecole stesse: il cortisone esplica entrambe le attività in misura eguale mentre i cortisonici di sintesi a lunga durata d'azione presentano una maggiore attività antiflogistica e un minor effetto sodio ritenitivo rispetto al principio naturale. Nel caso del desametasone, esso è circa venticinque volte più potente e ha una più lunga durata d'azione rispetto al cortisolo (Soma *et al.*, 2005).

Per quanto riguarda il bovino, il desametasone (soprattutto sodio fosfato) viene largamente utilizzato per il trattamento di disordini muscolo-scheletrici, chetosi primaria, reazioni allergiche, shock ipovolemico e affezioni cutanee di varia natura. Inoltre, esso viene spesso usato in associazione con agenti antimicrobici (antibiotici) con lo scopo di ridurre la durata della sintomatologia clinica ed è anche frequentemente somministrato nell'ultimo trimestre di gravidanza per indurre il parto (Van de Hauwe *et al.*, 2003).

Generalmente, la somministrazione di desametasone a scopo terapeutico avviene per via parenterale mediante incolo endovenoso (che garantisce una maggior rapidità di azione, indispensabile, ad esempio, in caso di shock) o per via intramuscolare (i.m.).(l'azione è prolungata grazie al lento rilascio di alcuni ester) (Ferguson *et al.*, 1999). Tuttavia, il desametasone risulta essere uno dei

cortisonici di sintesi che maggiormente viene impiegato in modo illecito in allevamento come promotore di crescita (Courtney *et al.*, 2002).

È importante, inoltre, ricordare gli effetti che i glicocorticoidi esercitano, a dosi farmacologiche, sul metabolismo proteico, glucidico e lipidico come riportato di seguito (Nebbia, 2009):

- metabolismo proteico: aumento del catabolismo delle proteine per induzione della sintesi di enzimi proteolitici, mobilitazione degli amminoacidi;
- metabolismo glucidico: riduzione dell'utilizzazione periferica e aumento della sintesi di glucosio a partire dagli amminoacidi (gluconeogenesi), accumulo di glicogeno nel fegato;
- metabolismo lipidico: incremento del catabolismo lipidico, mobilitazione e redistribuzione dei grassi.

Infine, è stato dimostrato come la somministrazione ripetuta di dosi relativamente elevate di cortisonici (vedi desametasone) determini un'induzione dell'espressione e dell'attività catalitica del citocromo P450 3A in alcune specie di laboratorio; indagini in merito condotte in vitelli a carne bianca sembrano escludere tale evenienza sia a dosaggi terapeutici che "auxinici", mettendo in luce, invece, una riduzione dell'espressione di tale importante isoforma nei processi biotrasformativi di una parte considerevole di farmaci veterinari (Nebbia, 2009).

Gli effetti tossici dei glicocorticoidi sono il principale fattore che limita il loro impiego in terapia. Infatti, possono causare fenomeni ipertensivi, iperglicemia e glicosuria con conseguente PU e PD e problemi di cicatrizzazione per deplezione della sintesi di collagene; la somministrazione ripetuta porta ad atrofia muscolare per eccessivo catabolismo proteico e incremento della suscettibilità alle infezioni (Anderson *et al.*, 1999). È noto, infine, il loro effetto teratogeno in gravidanza (Ferguson *et al.*, 1999).

Questi farmaci presentano un rapido assorbimento: se somministrati per os raggiungono il picco ematico dopo 2 ore, per via i.m. i massimi livelli ematici vengono raggiunti entro 1 ora (eccezion fatta per particolari composti esterificati a livello del C21). Una volta raggiunto il torrente circolatorio vengono veicolati principalmente dalla transcortina, una  $\alpha$ -globulina specifica, e in misura minore

dall'albumina. La percentuale di legame dei composti di sintesi con le proteine plasmatiche è inferiore a quella dei corrispondenti ormoni endogeni (che è circa il 90%) (Girolami *et al.*, 2010) e ciò è responsabile del fatto che i glicocorticoidi di sintesi presentino una maggior attitudine a trasferirsi nei tessuti rispetto a quelli naturali, esplicando così una azione farmacologica più rapida ed intensa.

## **1.2 IMPIEGO ILLECITO DEL DESAMETASONE**

Come riportato nel D.Lgs 158/2006 per “trattamento illecito” si intende “l'utilizzazione di sostanze o prodotti non autorizzati, ovvero di sostanze o prodotti autorizzati, a fini o a condizioni diversi da quelli previsti dalle disposizioni vigenti”. Pertanto, l'uso dei corticosteroidi al di fuori della regolare prescrizione da parte del Medico Veterinario e della conseguente annotazione in apposito registro è considerato un trattamento illecito.

Il desametasone può essere impiegato in modo fraudolento sia da solo sia in combinazione con altri promotori di crescita vietati, come i  $\beta$ -agonisti, per incrementare il peso degli animali (Illera *et al.*, 2007). Tale associazione, infatti, determina un potenziamento dell'effetto lipolitico, l'attenuazione di alcuni effetti negativi sul muscolo e la riduzione dell'intensa glicogenolisi in ambito epatico (la diminuzione delle riserve di glicogeno può costituire una indagine collaterale per l'emissione di sospetto di trattamenti con  $\beta$ -agonisti, ai sensi della circolare applicativa del D.Lgs 4/8/1999 n. 336, modificata dal D.Lgs 158/2006. Inoltre, verosimilmente a causa della poliuria e polidipsia che induce, è capace di provocare una deplezione dei livelli urinari di alcuni  $\beta$ -agonisti e di altri farmaci. Secondo alcuni Autori Olandesi i corticosteroidi di sintesi vengono utilizzati in modo fraudolento al fine di diminuire l'entità dei fenomeni flogistici che si verificano in corrispondenza del sito di inoculo di principi attivi consentiti o illeciti (come gli steroidi sessuali) in caso di somministrazioni ripetute per via i.m. (Nebbia, 2009).

Da tale discorso si evince, quindi, come il desametasone eserciti una azione sinergica nei confronti di altri promotori di crescita quali, appunto,  $\beta$ -agonisti e

steroidi anabolizzanti (Courtheyn *et al.*, 2002) vanificando, in parte, l'opera degli organi di controllo.

Nei diversi Paesi Membri della Comunità Europea sono stati condotti controlli ufficiali dai quali è emersa la presenza di residui di glicocorticoidi in cocktail di preparazioni illegali nei mangimi, nei siti di inoculo, nelle urine e negli organi soprattutto nei bovini da carne. Tale fenomeno è, purtroppo, molto diffuso anche in Italia: nel 2007 le positività per il desametasone nella specie bovina sono state 23 (a fronte di un numero totale pari a 29) confermando, quindi, la diffusione di tale pratica fraudolenta anche nel nostro paese ([http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc\\_2007\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf)).

Il motivo per il quale i glicocorticoidi vengono ampiamente utilizzati come promotori di crescita risiede, come spiegato in precedenza, nella loro capacità di determinare effetti “favorevoli” a bassi o bassissimi dosaggi, ben inferiori a quelli utilizzati per scopi terapeutici. Infatti, se impiegati in quantità basse e per lunghi periodi (3-6 settimane) per os o i.m., mediante preparazioni ritardo, si ha una influenza positiva sull'accrescimento degli animali e sulla qualità delle carni. A comprovare ciò, sono stati eseguiti diversi studi sperimentali sia su vitelloni sia su vitelli a carne bianca che hanno dimostrato come il desametasone migliori l'indice di conversione, la conformazione delle carni e aumenti in modo moderato il volume delle masse muscolari (Corah *et al.*, 1995, Gottardo *et al.*, 2008). In particolare, questo ultimo effetto, che è stato rilevato a carico del muscolo *longissimus dorsi*, è stato messo in connessione con l'aumento dei livelli plasmatici di insulina che determina una diminuzione del catabolismo proteico e un incremento della sintesi di nuove proteine attraverso l'aumento della captazione di amminoacidi (Corah *et al.*, 1995). Tale ipotesi è stata avvalorata anche da esperimenti condotti su linee cellulari di miociti di ratto: l'incubazione di basse dosi di desametasone ha portato, infatti, ad un potenziamento dell'effetto mitogeno indotto dall'insulina e dall'Insulin Growth Factor (IGF) (Giorgino e Smith, 1995).

I glicocorticoidi, inoltre, modificano in modo vantaggioso anche il valore commerciale delle carcasse e le qualità organolettiche della carne: la somministrazione orale di basse dosi di desametasone in vitelli a carne bianca determina un colorito più pallido e una maggior tenerezza, che sono

caratteristiche particolarmente apprezzate dal consumatore (Tarantola *et al.*, 2004).

Come sottolineato precedentemente, questi composti possono essere utilizzati da soli o in associazione ad altri promotori di crescita, quali  $\beta$ -agonisti o steroidi anabolizzanti, con lo scopo di sfruttare il sinergismo d'azione tra i diversi principi attivi. In particolare, il desametasone è in grado di attenuare la down-regulation dei recettori  $\beta$ -adrenergici garantendo, quindi, una maggior efficacia del  $\beta$ -agonista per tempi più lunghi (Abraham *et al.*, 2004). In uno studio condotto sui linfociti di vitelloni a carne bianca sperimentalmente trattati con  $17\beta$ -estradiolo e clenbuterolo, la riduzione della concentrazione dei recettori  $\beta$ -adrenergici, che si verifica durante il trattamento con il  $\beta$ -agonista, viene attenuata dalla concomitante somministrazione del glicocorticoide (Odore *et al.*, 2007).

A quanto detto sin ora si deve aggiungere anche la capacità del desametasone di provocare, da un lato, il potenziamento dell'effetto lipolitico e, dall'altro, la riduzione di alcuni effetti negativi sul muscolo e sull'intensità della glicogenolisi epatica indotti dai composti  $\beta$ -adrenergico-mimetici (Silvan *et al.*, 2007).

L'associazione tra desametasone e altri promotori di crescita trova giustificazione anche dalla possibilità di contrastare in questo modo, almeno in parte, le indagini condotte dagli organi di controllo. Infatti, questi composti, inibendo l'ormone antidiuretico (ADH), determinano una condizione di poliuria e polidipsia che provoca una deplezione della concentrazione urinaria delle altre molecole somministrate a scopo illecito (Vincenti *et al.*, 2009), rendendo così più difficoltoso il riscontro delle positività alle stesse. Infine, l'attività antiflogistica viene sfruttata in modo fraudolento per ridurre, nel sito di inoculo, le lesioni derivanti da somministrazioni ripetute per via i.m. di sostanze più o meno consentite: infatti, l'impiego di preparazioni ritardo per via i.m. può determinare elevate concentrazioni del farmaco nel punto di inoculo (De Wasch *et al.*, 1998).

### 1.3 LEGISLAZIONE VIGENTE

L'Unione Europea, al fine di garantire la salubrità degli alimenti, stabilisce una rigida regolamentazione per quanto concerne l'uso illegale dei promotori della crescita negli animali produttori di derrate alimentari. Con la Direttiva 96/22/CE, successivamente modificata dalla Direttiva 2008/97/CE, si fa divieto di somministrare alcune sostanze ad azione ormonale, tireostatica e delle sostanze  $\beta$ -agoniste. Considerando la necessità di potenziare e uniformare i controlli condotti dagli stati membri contro l'uso dei composti illeciti nell'allevamento, l'UE ha emanato la Direttiva 96/23/CE "concernente le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti". In entrambe le direttive sono descritte le linee guida da adottare per la ricerca e il rilevamento di determinate molecole in animali, alimenti e nei prodotti di origine animale.

In Italia, il recepimento della normativa europea in materia di trattamenti illeciti negli animali produttori è avvenuto mediante il D.Lgs 336/99, successivamente sostituito senza modifiche dal D.Lgs 158/06 che vieta la somministrazione di qualsiasi sostanza avente effetto anabolizzante agli animali d'azienda a meno che ciò non avvenga nel rispetto della normativa vigente e dei tempi di sospensione minimi previsti.

Per quanto concerne i corticosteroidi, e in particolar modo i composti di sintesi, data la loro potente azione farmacologica è importante che essi vengano impiegati in allevamento solo a scopo terapeutico in quanto i residui nelle derrate alimentari possono rappresentare un rischio per la salute del consumatore. Ogni trattamento deve essere regolarmente documentato: il veterinario ufficiale deve rilasciare ricetta in triplice copia e riportare nell'apposito registro l'avvenuta somministrazione unitamente all'identificazione dei soggetti trattati e ai tempi di sospensione previsti.

Dal 1988 è stato introdotto in Italia il "Piano Nazionale residui" (PNR) con l'obiettivo di salvaguardare la salute pubblica e salubrità degli alimenti di origine animale; attualmente esso si struttura sulla base delle disposizioni del D.Lgs 158/06 e sue successive modifiche. La sua funzione è quella di identificare eventuali casi di trattamento illecito e di verificare le conformità dei residui dei medicinali veterinari con i limiti massimi residuali (LMR) indicati nel Regolamento

2377/90/CEE, ora modificato dal Regolamento (CE) 470/2009. Il Regolamento 2377/90/CEE prevede, infatti, che ciascun farmaco destinato ad animali produttori non possa essere impiegato in UE e, quindi, anche in Italia, se prima non sono stati fissati gli LMR; questi rappresentano le concentrazioni massime del farmaco che sono ammesse nei tessuti provenienti da animali trattati e che non devono essere mai superate per tutelare la salute del consumatore. A fronte dell'elevato potere farmacologico del desametasone e dei rischi associati alla sua presenza negli alimenti, tale regolamento ha fissato per la specie bovina, suina ed equina degli LMR molto bassi: 0,75 µg/kg per il muscolo e il rene, 2 µg/kg per il fegato e 0,3 µg/kg per il latte. Queste concentrazioni garantiscono che non venga superata una dose giornaliera accettabile (DGA) pari a 0,9 µg/die, calcolata sulla base di un *no effect observed limit* (NOEL) di 1,5 µg/kg visto che il desametasone, a dosi maggiori, induce le amino-transferasi epatiche (EMEA Dexamethasone summary report, 2004). Negli Stati Uniti, la Food and Drug Administration non ha addirittura ritenuto possibile fissare degli appropriati LMR per il desametasone e il betametasone e un simile comportamento è stato adottato dagli analoghi organismi di controllo di Giappone, Canada, Australia e Corea; in tali Paesi vige, pertanto, la regola del c.d. "residuo zero" per tali cortisonici di sintesi.

Nel PNR le sostanze sono divise in due categorie:

- Categoria A: sostanze ad effetto anabolizzante e sostanze non autorizzate (stilbeni, loro derivati e loro sali e esteri, agenti antitiroidei, steroidi, lattoni dell'acido resorcilico compreso lo zeranolo, β-agonisti e sostanze incluse nell'Allegato IV del Regolamento (CEE) 2377/90);
- Categoria B: medicinali veterinari e agenti contaminanti (sostanze antibatteriche, antielmintici, coccidiostatici, carbammati e piretroidi, tranquillanti, antiinfiammatori non steroidei, altre sostanze esercitanti un'attività farmacologica, agenti contaminanti per l'ambiente, composti organoclorurati compresi PCB, organo fosforati, elementi chimici, micotossine e coloranti) (PNR 2011).

I corticosteroidi sono inclusi nella categoria A3 (steroidi) sottolineando la possibilità che questi vengano impiegati come agenti anabolizzanti.

Il Piano Nazionale Residui viene aggiornato annualmente dal Ministero della Salute e stabilisce, inoltre, le specie, le categorie, i punti di campionamento, le sostanze da ricercare e le modalità con cui tale ricerca deve essere svolta in accordo con la normativa vigente e le indicazioni della Commissione Europea. Inoltre, prevede che vengano trasmessi i risultati ottenuti a tale commissione.

Dai piani di monitoraggio che sono stati condotti sul nostro territorio è emerso che l'utilizzo dei corticosteroidi è ancora ampiamente diffuso nell'allevamento del bovino da carne: i risultati ufficiali dei controlli analitici eseguiti nei diversi paesi membri hanno evidenziato che il numero dei casi segnalati è aumentato da 51 nel 2007 a 56 nel 2008 con una netta prevalenza in Italia (33 positivi contro 31 del 2007); il desametasone, in particolare, si è confermato come composto maggiormente impiegato con 39 non conformità.

Per migliorare l'efficacia dei controlli ufficiali, il Ministero della Salute, fra il 2004 e il 2006, ha disposto un piano di monitoraggio basato sull'osservazione delle alterazioni isto-patologiche provocate dall'uso illecito di sostanze sugli organi bersaglio di bovini macellati (285 vitelli a carne bianca e 1035 vitelloni da carne) (PNR 2008). Dalle analisi istologiche l'11% dei casi sul totale dei campioni considerati è risultato sospetto. Per quanto riguarda la classe dei corticosteroidi, i test eseguiti sul timo hanno evidenziato il 7% di casi sospetti e l'11% di casi dubbi. Bisogna però sottolineare che i piani di monitoraggio basati su test istologico non possono sostituire l'analisi chimico-fisica dei residui nelle matrici animali: essa, infatti, rimane l'unico metodo avente validità giuridico-legale.

#### **1.4 INDIVIDUAZIONE DEI TRATTAMENTI ILLECITI**

Le alterazioni cliniche e anatomo-patologiche derivanti dalla somministrazione prolungata di glicocorticoidi a basse dosi sono difficilmente evidenziabili. In allevamento, risulta sospetto il riscontro di segni quali poliuria e polidipsia mediante il rilevamento della lettiera bagnata; al macello, post mortem, si possono invece notare lesioni a carico del timo che si presenta atrofico, diminuito di peso, con aumento della componente adiposa e connettivale. Tale riscontro è



evidente soprattutto nei vitelli a carne bianca dove, accanto a fenomeni atrofici, si repertano anche segni di rigenerazione; nei vitelloni, invece, le alterazioni si palesano maggiormente a livello citologico con la presenza nella corticale del caratteristico pattern a “cielo stellato” come conseguenza dei molteplici linfociti apoptotici e fagocitati dai macrofagi che appaiono come tanti punti chiari su sfondo scuro (Biolatti, 2009).

Per quanto riguarda le indagini ufficiali, il PNR prevede che le matrici da prelevare per effettuare la ricerca dei residui siano l'urina (in allevamento) e il fegato (al macello); recentemente è stato proposto come matrice per il monitoraggio in vivo anche il pelo (Van Den Hauwe *et al.*, 2005).

La metodica di screening prevista per la ricerca di residui del desametasone nei tessuti animali è l'ELISA; per la conferma di eventuali sospetti si deve ricorrere, invece, alla gas cromatografia (GC) o alla cromatografia liquida (LC) accoppiate alla spettrometria di massa (MS). L'analisi deve avvenire esclusivamente con metodi validati secondo quanto previsto dalla Decisione 2002/657/CE. In particolare, la tecnica LC-MS/MS risulta essere la più adatta e potente tecnica per identificare in modo inequivocabile i corticosteroidi (Antignac *et al.*, 2005).

Per poter decidere quale sia il composto più vantaggioso da ricercare (la molecola in forma libera o i suoi metaboliti) è necessario conoscere le caratteristiche farmacocinetiche dello xenobiotico impiegato, per poter rilevare le positività in seguito a trattamento illecito.

La biotrasformazione può essere considerata come un processo bifasico: ossidazione, riduzione, dealogenazione e idrolisi sono tra le principali reazioni definite di Fase I, mentre le reazioni di coniugazione e sintesi rappresentano le reazioni di Fase II. Le reazioni di Fase I trasformano i substrati in composti più idrosolubili; la loro funzione primaria è quella di aggiungere e di esporre determinati gruppi funzionali nella molecola che viene metabolizzata per consentire, così, che essa possa subire ulteriori processi metabolici mediante le reazioni di Fase II. Queste ultime sono delle reazioni biosintetiche con molecole endogene (ad es.: acido glucuronico, acido acetico, ecc.) che portano alla formazione di un coniugato dotato di maggior solubilità in acqua ed elevata ionizzazione a pH fisiologico. Il fegato è l'organo che, quantitativamente, è maggiormente coinvolto nelle reazioni di biotrasformazione (Nebbia *et al.*, 2003).

Le due famiglie enzimatiche responsabili delle biotrasformazioni di Fase I sono: il sistema delle monoossigenasi citocromo P450 dipendenti, o monoossigenasi a finzione mista (MFO), e il sistema delle monoossigenasi flaviniche (FMO). La superfamiglia del P450 è implicata non solo nel metabolismo di sostanze esogene ma anche di molti composti endogeni quali ormoni steroidei, acidi biliari, prostaglandine, leucotrieni, acidi grassi e vitamine. Le biotrasformazioni ossidative di Fase I sono le reazioni più importanti per il metabolismo degli steroidi (Van Puymbroeck *et al.*, 1998a) e gli enzimi coinvolti sono quasi esclusivamente localizzati a livello cellulare, precisamente nel reticolo endoplasmatico.

I metaboliti polari che così si formano sono per lo più inattivi e vengono escreti prevalentemente per via urinaria; nei ruminanti, tuttavia, una buona percentuale (circa il 25%) viene escreta anche attraverso la bile (Girolami *et al.*, 2010). Le modificazioni strutturali che i composti sintetici presentano fanno sì che questi ultimi, a differenza delle molecole naturali, vengano metabolizzati in misura minore e più lentamente, caratteristica che, ancora una volta, ne prolunga la durata d'azione (Nebbia, 2009).

L'evidenziazione dei metaboliti degli ormoni steroidei nell'urina può essere una valida alternativa alla ricerca del composto d'origine, soprattutto se sottoposto ad intensa biotrasformazione, e alla discriminazione tra composti endogeni ed esogeni (Antignac *et al.*, 2002; Antignac *et al.*, 2005). Infatti, alcuni ormoni sintetici, essendo strutturalmente simili ai loro analoghi naturali, possono essere prodotti, in certi casi, anche dal metabolismo endogeno degli animali. Un esempio a tal riguardo è quello del nortestosterone: il  $17\beta$ -nortestosterone è presente naturalmente nel maiale e il suo isomero, il  $17\alpha$ -nortestosterone, può essere di origine endogena nelle urine delle vacche gravide e nei vitelli neonati (Daeseleire *et al.*, 1993). È stato dimostrato, inoltre, che nel maiale non castrato anche il  $17\beta$ -boldenone può essere di origine endogena (Poelmans *et al.*, 2005). Per quanto riguarda il boldenone, a causa dei dati discordanti disponibili in letteratura derivati da prove sperimentali di somministrazione, in alcuni paesi il  $17\alpha$ -boldenone era ritenuto di origine endogena, in altri (come l'Italia) era considerato un marker di trattamento illecito (De Brabander *et al.*, 2004). In seguito ad un improvviso incremento delle non conformità riguardanti il

boldenone (sia  $17\beta$ -boldenone che  $17\alpha$ -boldenone) rilevate alla fine del 2000 nei paesi dell'Unione Europea, sono stati intrapresi numerosi studi allo scopo di ottenere ulteriori informazioni sul metabolismo e l'origine del boldenone nel bovino. In base alle attuali conoscenze, il  $17\alpha$ -boldenone è considerato essere di origine endogena e, pertanto, la sua presenza non è sufficiente a dimostrare un trattamento illegale. Al contrario, il  $17\beta$ -boldenone urinario può essere sfruttato come marker per identificare gli animali sospetti poiché, in assenza di trattamento, non si rilevano residui di  $17\beta$ -boldenone (libero o coniugato). In particolare, dato che esso viene eliminato nell'urina sotto forma di coniugato, l'analisi di tale matrice biologica, con e senza deconiugazione enzimatica dei cataboliti di Fase II, fornisce un ulteriore elemento per confermare l'origine esogena del  $17\beta$ -boldenone (De Brabander *et al.*, 2004).

Soltanto pochi studi sono stati dedicati a definire la natura e le proporzioni relative tra i diversi metaboliti di Fase I e II (Antignac *et al.*, 2004) nel bovino; in letteratura sono riportati lavori sul cavallo (Skrabalak *et al.*, 1982), sui roditori (Antignac *et al.*, 2004) e sull'uomo (Vree *et al.*, 1999).

## 2. SCOPO DELLA TESI

L'obiettivo di questo lavoro è stato lo studio dell'eliminazione urinaria del desametasone nel bovino in seguito a trattamenti con dosi "omeopatiche".

A questo scopo è stato messo a punto e validato un metodo analitico LC-MS/MS/MS per l'analisi di campioni di urina di bovino, provenienti da un piano sperimentale di trattamento con desametasone. Il metodo sviluppato è stato applicato per studiare, *in vivo*, il metabolismo di questo glicocorticoide al fine di ottenere nuove informazioni utili a rilevare con maggiore efficacia i soggetti sottoposti a trattamento illecito.

### **3. MATERIALI E METODI**

#### **3.1 SOGGETTI DELLA SPERIMENTAZIONE**

Nel piano sperimentale sono stati impiegati 16 vitelloni maschi incroci di Razza Francese. Gli animali, all'età di 15 mesi (peso medio di  $500 \pm 10$  kg), sono stati stabulati in condizioni controllate presso un allevamento autorizzato di Brugine (Padova) per circa due mesi. Lo studio è stato eseguito seguendo le linee guida previste dalla normativa italiana sul benessere e uso degli animali per scopi scientifici (D.Lgs 116/92) e il progetto è stato approvato dal Ministero della Salute.

Gli animali sono stati stabulati in box separati contenenti quattro vitelloni ciascuno. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi: un gruppo di controllo (gruppo K,  $n^{\circ}=8$ ) e un gruppo sperimentale di trattamento (gruppo T,  $n^{\circ}=8$ ). Il gruppo T è stato trattato con desametasone (Desashock; Fortdodge Animal Health) alla dose di 0,75 mg/capo/die per 43 giorni; la preparazione farmaceutica è stata disciolta in 500 ml di acqua e successivamente posta sullo strato superficiale dell'alimento unifed.

#### **3.2 RACCOLTA DEI CAMPIONI DI URINA**

I campioni di urina destinati ad essere analizzati sono stati prelevati il giorno 19 (d19) e il giorno 43 (d43) dopo l'inizio del trattamento e 2 e 4 giorni dopo la sospensione della somministrazione orale di desametasone (prelievi al macello; d45 e d47). In allevamento i prelievi sono stati effettuati al mattino a partire dalle  $7.30 \pm 0,30$  a.m., aspettando la minzione spontanea di tutti gli animali. A questo scopo sono stati impiegati appositi contenitori puliti per evitare qualsiasi cross contaminazione e contaminazione fecale.

Alla fine del trattamento, i sedici vitelloni coinvolti nello studio sono stati sacrificati, seguendo la normativa vigente sul benessere animale durante la

macellazione (D.Lgs 623/85), in un impianto di macellazione certificato CEE. Dopo 45 giorni dall'inizio dell'esperimento (2 giorni dopo la sospensione del trattamento) sono stati macellati sei soggetti appartenenti al gruppo K e sei del gruppo T; il giorno 47 ( 4 giorni dalla fine del trattamento) sono stati macellati due animali del gruppo K e due del gruppo T. I prelievi di urina al macello sono stati effettuati direttamente dalla vescica mediante cistocentesi.

In ogni giorno di prelievo da ciascun animale sono stati raccolti 50 ml di urina che sono stati divisi in provette in aliquote di 15 ml, senza aggiunta di nessun conservante. I campioni così ottenuti sono stati poi conservati a -20° C fino al momento delle analisi.

### **3.3 ANALISI DELLE URINE MEDIANTE LC-MS/MS/MS**

#### **3.3.1 REAGENTI E SOLVENTI**

- acqua ultrapura Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA)
- metanolo HPLC grade (Carlo Erba, Milano, Italia)
- desametasone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- standard interno: cortisolo-d4 (CDN Isotopes, Pointe-Claire, Quebec, Canada)
- $\beta$ -glucuronidasi ( $\beta$ -glucuronidasi 94612 unità/ml; sulfatasi 1079 unità/ml) da preparato di *Helix pomatia* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- acido formico LC-MS grade (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- tampone acetato 1M pH 5

#### **3.3.2 PREPARAZIONE DELLE SOLUZIONI STANDARD**

A partire da una soluzione di riferimento di concentrazione 1 mg/ml (ottenuta sciogliendo 10 mg di standard con 10 ml di metanolo), mediante diluizioni successive, sono state allestite due soluzioni di lavoro con concentrazioni pari a 1  $\mu$ g/ml e 0,1  $\mu$ g/ml.

La curva di calibrazione degli standard è stata preparata giornalmente diluendo le due soluzioni di lavoro con la fase mobile formata da H<sub>2</sub>O MQ, metanolo ed acido formico (50:50:0,1, v:v:v) con l'aggiunta dello standard interno. I dettagli della preparazione della retta degli standard è riportata nella Tabella 1:

Tabella 1: Schema per la preparazione della retta degli standard.

<b>[ ]</b> <b>(ng/ml)</b>	<b>DEX</b> <b>(ng/ml)</b>	<b>Volume (µl)</b>	<b>[SI]</b> <b>(ng/ml)</b>	<b>Volume (µl)</b>	<b>Fase</b> <b>mobile</b> <b>(µl)</b>
0,5	100	10	1000	80	2000
1	100	20	1000	80	2000
2,5	100	50	1000	80	2000
5	100	100	1000	80	2000
10	1000	20	1000	80	2000
25	1000	50	1000	80	2000
50	1000	100	1000	80	2000
100	1000	200	1000	80	2000

DEX: desametasone      SI: standard interno

All'inizio e alla fine di ciascuna sessione di lavoro le soluzioni standard sono state analizzate per verificare la risposta strumentale.

### 3.3.3 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

L'estrazione in fase solida (SPE) è un metodo rapido e semplice nel quale una fase solida stazionaria è impaccata in un supporto come, ad esempio una colonnina, ed è usata per estrarre, concentrare e purificare degli analiti prima di effettuare una determinazione analitica. Questa metodica ha, nel tempo, soppiantato la tradizionale estrazione liquido:liquido in quanto più efficace, più selettiva, più specifica, meno costosa e maggiormente ripetibile e riproducibile. Esistono diversi tipi di colonnina SPE che differiscono per la composizione della matrice solida oltre che per capacità, diametro delle particelle e per diametro dei pori. Le più comuni colonnine sono composte da un substrato di particelle silicee modificate (o resine) che in superficie presentano dei gruppi funzionali polari o

apolari legati covalentemente; tali gruppi devono essere scelti in base alle caratteristiche chimico-fisiche della molecola da estrarre.

Un metodo di estrazione si definisce “in fase inversa” quando vengono impiegate delle colonnine che presentano dei gruppi funzionali specifici per captare molecole idrofobiche, come per esempio le colonnine C18 che contengono composti con catene a 18 atomi di carbonio e che sono state utilizzate in questa sperimentazione.

In questo lavoro è stato applicato un metodo SPE precedentemente messo a punto e utilizzato per la ricerca dei corticosteroidi naturali nell'urina del bovino (Isaia, 2010).

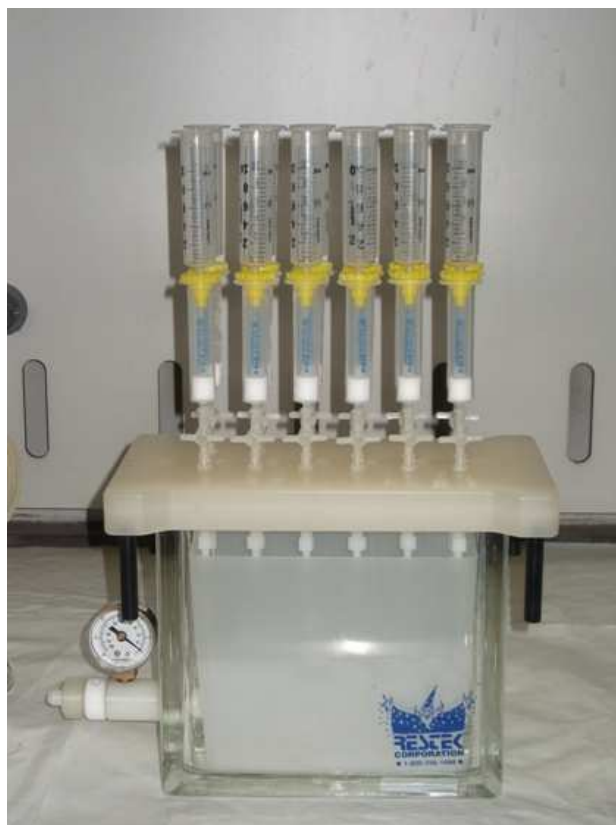


Figura 3: Camera di eluizione impiegata.

I campioni di urina da analizzare sono stati scongelati a temperatura ambiente. Dopo centrifugazione, da tutti i campioni è stata prelevata una aliquota di 5 ml di urina a cui sono stati addizionati 25  $\mu$ l della soluzione di standard interno (1 $\mu$ g/ml) e 15 ml di una soluzione 1M di tampone acetato (pH 5) per ottenere un



pH prossimo a 5 in modo tale da favorire l'azione dell'enzima  $\beta$ -glucuronidasi aggiunto in quantità di 50  $\mu$ l. Successivamente i campioni sono stati incubati per 15 ore alla  $T^\circ$  di 50  $^\circ$ C. La preparazione è stata ripetuta su due distinte aliquote includendo od omettendo l'aggiunta e l'incubazione con la  $\beta$ -glucuronidasi.

La separazione dalla matrice biologica e la successiva purificazione del desametasone e dei suoi metaboliti è stata effettuata usando un metodo di eluizione con due diverse colonne SPE in sequenza; il campione ottenuto dalla prima estrazione in una colonna C18 è stato successivamente purificato in una colonna in cui la fase stazionaria presentava gruppi  $\text{NH}_2$  in grado di garantire un'ulteriore purificazione del campione. Tutto ciò si è reso necessario per soddisfare l'esigenza di assenza di interferenti nell'estratto da sottoporre ad analisi LC-MS/MS/MS.

La camera di eluizione utilizzata (Figura 3) ha una struttura tale da permettere il caricamento di 12 cartucce SPE. Per l'estrazione di un volume di 16 ml di campione, sono stati utilizzati dei serbatoi da 20 ml collegati alle cartucce da appositi riduttori. La camera di eluizione è stata collegata, inoltre, ad una pompa a vuoto; il tempo necessario per lo svolgimento dell'estrazione in doppia colonna è stato di circa tre ore. C'è da sottolineare anche la particolare attenzione rivolta al lavaggio della camera di eluizione in tutte le sue componenti, dei riduttori e dei serbatoi che venivano poi riutilizzati per le successive estrazioni.

La prima fase della procedura di estrazione ha previsto l'impiego delle cartucce Strata C18-U ( 500mg, Phenomenex). Questo primo tipo di colonna fase inversa (C18), che ha affinità per i gruppi lipofili, è stata attivata con 5 ml di metanolo e, a seguire, 5 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  MQ (in entrambi i casi senza portare a secco). Si è proceduto poi a caricare 16 ml di urina da ciascun campione contenuto nelle provette falcon facendo eluire per gravità, quindi le colonne sono state asciugate con l'impiego di una pompa a vuoto. La fase successiva è consistita nel lavaggio delle colonne stesse mediante 10 ml di  $\text{H}_2\text{O}$  MQ e a seguire 10 ml di una soluzione di  $\text{H}_2\text{O}$  e metanolo al 20%. Alla fine del lavaggio le colonnine sono state asciugate con la pompa a vuoto. Tali lavaggi hanno permesso di eliminare le impurità in modo tale che nelle colonnine rimanessero solo le sostanze di interesse, in questo caso il desametasone e i suoi metaboliti. Sono poi stati caricati 2 ml di metanolo in ogni colonna, si è lasciato scendere per gravità con

calma senza forzare il flusso e l'eluato così ottenuto è stato raccolto in apposite provette.

A questo punto si è provveduto a sostituire le colonne con quelle del secondo tipo Strata NH<sub>2</sub> (100 mg Phenomenex) che sono in grado di formare legami ancora più specifici con le molecole che noi volevamo ricercare. Ciascuna colonna è stata condizionata con 1 ml di metanolo (senza lasciar andare a secco) e successivamente caricata, utilizzando una pipetta pasteur, con l'eluato in precedenza ottenuto con le C18 e raccolto in provette. Si è atteso che per gravità scendesse e, quindi, il percolato è stato raccolto in provette opportunamente siglate. I campioni sono poi stati portati a secco con evaporatore in corrente d'aria a 45°-55° C; man mano che i campioni sono andati a secco sono stati ripresi con 500 µl di fase mobile e successivamente mescolati con vortex prima di effettuare l'analisi LC-MS/MS/MS.

#### 3.3.4 PREPARAZIONE DELLA RETTA DI CALIBRAZIONE

Per ciascuna sessione di analisi un numero adeguato di aliquote di urina, provenienti da un pool ottenuto dal gruppo di animali di controllo, è stato addizionato in modo da ottenere una concentrazione di 2,5 ng/ml di standard interno e sei diverse concentrazioni di desametasone (0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5 e 10 ng/ml). I campioni così allestiti sono stati sottoposti all'intera procedura (estrazione SPE ed analisi in LC-MS3) e i dati ottenuti sono stati impiegati per costruire le curve di calibrazione in matrice.

#### 3.3.5 CROMATOGRAFIA LIQUIDA

La cromatografia liquida ad alta pressione (HPLC) è una tecnica cromatografica che permette l'identificazione, mediante separazione, di due o più composti presenti in una miscela: tali analiti vengono estratti precedentemente da una matrice mediante un processo di estrazione in fase solida e purificati, come spiegato in precedenza. La separazione dei composti si realizza sfruttando l'equilibrio di affinità tra una "fase stazionaria" solida, costituita da un supporto inerte contenuto all'interno della colonna cromatografica, e una "fase mobile"

liquida (costituita da miscele di solventi organici e da una fase acquosa che può essere costituita da acqua o tamponi) che fluisce attraverso essa. Una sostanza più affine alla fase stazionaria rispetto alla fase mobile impiega un tempo maggiore per percorrere la colonna (tempo di ritenzione maggiore) rispetto ad una sostanza con bassa affinità per la fase stazionaria e alta affinità per la fase mobile.

Tramite HPLC i diversi composti vengono separati in base alla loro affinità per la fase mobile costituita da:

A.= 0,1% acido formico (V/V) in H<sub>2</sub>O

B.= 0,1% acido formico(V/V) in metanolo

È stata usata una pompa Accella 600 HPLC con iniettore CTC automatico (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA). La cromatografia liquida fase inversa è stata eseguita mediante una colonna Thermo Hypersil Gold 100x2,1 mm i.d.; 1,9 µm.

Il gradiente utilizzato è stato il seguente (Tabella 2):

Tabella 2: Gradiente di eluizione applicato.

<b>Tempo</b>	<b>A%</b>	<b>B%</b>	<b>µl/min</b>
0.00	90	10	200
4.00	50	50	200
16.00	50	50	200
18.00	10	90	200
18.50	10	90	200
19.00	90	10	200
21.00	90	10	200

La durata dell'analisi è stata di 21 minuti.

Il campione è stato mantenuto a 4 °C e un volume di 10 µl di campione è stato iniettato per l'analisi.

### 3.3.6 SPETTROMETRIA DI MASSA

L'analisi spettrometrica di massa è stata condotta usando una trappola ionica LTQ XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA).

La spettrometria di massa è una tecnica analitica che si basa sulla possibilità di separare una miscela di ioni in funzione del loro rapporto massa/carica ( $m/z$ ) tramite campi magnetici. Tale metodica si fonda sul fatto che uno ione in movimento può essere deflesso da un campo magnetico di un angolo che dipende dalla sua massa e dalla sua velocità.

Lo spettrometro di massa è collegato all'HPLC mediante una interfaccia a elettro-nebulizzazione (ESI). La sorgente ESI è responsabile della nebulizzazione, desolvatazione, evaporazione e ionizzazione post-colonna della fase mobile proveniente dall'HPLC. La fase mobile viene nebulizzata attraverso un sottile capillare e, grazie all'azione del flusso di azoto e di un campo elettromagnetico, fuoriesce sotto forma di aerosol. Lo spray fine di goccioline cariche in superficie per azione del campo elettrostatico imposto è circondato dal gas azoto riscaldato che consente la parziale evaporazione del solvente. Le goccioline diminuiscono progressivamente di volume mantenendo però la stessa quantità di carica fino ad arrivare ad esplodere, liberando gli ioni di analita che vengono convogliati all'interno della trappola ionica.

Uno spettro di massa viene definito come un grafico che riporta l'abbondanza degli ioni pseudo-molecolari e/o degli ioni ottenuti con la frammentazione in funzione della massa (Gordon, 1995).

La ionizzazione positiva o negativa avviene in base alla tipologia di campo elettrostatico applicato alla sorgente ionica: lo spettrometro configurato in "modalità negativa" separa e rileva ioni carichi negativamente (Barrett Y. *et al.*, 2005).

La polarità scelta in questo studio è stata quella negativa (ESI-).

I parametri utilizzati per effettuare l'analisi sono i seguenti:

- sheath and auxiliary gas flow (azoto) 30 and 10 arbitrary units;
- ion spray voltage 2 kV;
- capillary temperature 275°C;
- capillary voltage -13 V;
- tube lens -68 V.

I dati ottenuti sono stati analizzati mediante il software Xcalibur (version 2.1).

La quantificazione del composto oggetto di studio è stata effettuata utilizzando una curva di calibrazione in matrice.

La retta ottenuta è stata costruita ponendo come parametro sull'asse delle y il rapporto tra l'area dell'analita e l'area dello standard interno (l'area esprime l'intensità del segnale) e sull'asse delle x la concentrazione del composto contenuto nei campioni addizionati.

Lo standard interno è una sostanza chimica che viene aggiunta in quantità nota a tutti i campioni processati. L'utilizzo dello standard interno permette di correggere la perdita della molecola oggetto di studio durante la preparazione e l'analisi del campione assumendo che lo standard interno subisca una perdita analoga. Per questa ragione lo standard interno è un composto che deve comportarsi in maniera analoga alla specie chimica di interesse, dato che gli effetti della preparazione del campione sul segnale dello standard interno e dell'analita presente nel campione stesso devono essere il più simili possibile.

La valutazione quantitativa del composto da studiare nei diversi campioni è stata completata correggendo i dati ottenuti per il recupero stimato con l'impiego degli addizionati.

### **3.4 VALIDAZIONE DEL METODO**

Il rendimento del metodo è stato valutato considerando i seguenti parametri:

- specificità;
- intervallo di linearità;
- recupero;
- precisione, in termini di ripetibilità (entro la giornata di lavoro) e di riproducibilità a livello di laboratorio (differenti operatori e condizioni ambientali);
- limite di rilevabilità (LOD) e di quantificazione (LOQ).

La tecnica LC-MS/MS/MS garantisce in se stessa un elevato grado di selettività e specificità (Ferranti *et al.*, 2011). La specificità/selettività del metodo è stata

verificata mediante la valutazione diretta dei cromatogrammi ottenuti dall'analisi dei campioni di urina provenienti dal gruppo di controllo, dei campioni addizionati e dei campioni degli animali trattati. Si è proceduto a verificare la presenza di picchi extra nel range del tempo di ritenzione dell'analita considerato negli *extracted ion chromatogram* (XIC) degli ioni prodotto considerati; a tal fine sono stati analizzati 20 campioni bianchi, cioè provenienti da animali non trattati con desametasone.

I criteri applicati per l'identificazione dell'analita sono quelli previsti dalla Decisione 2002/657/EC nel caso della combinazione della cromatografia liquida con spettrometria di massa.

Per quanto riguarda l'HPLC, si è controllata la corrispondenza tra il tempo di ritenzione relativo dello standard in metanolo e quello osservato nei campioni addizionati ammettendo una possibile tolleranza del  $\pm 2,5\%$ . Il tempo di ritenzione relativo, calcolato come rapporto tra i tempi di ritenzione dell'analita nei campioni esaminati e dello standard interno, è più affidabile rispetto al tempo di ritenzione assoluto perché durante il procedimento possono intervenire vari fattori (ad esempio la temperatura) che possono andare ad alterare i risultati della metodica impiegata.

Considerando la spettrometria di massa, per l'identificazione dell'analita, si è valutato che nei campioni addizionati e positivi il rapporto tra gli ioni prodotto considerati risultasse essere entro la tolleranza raccomandata rispetto allo standard.

L'intervallo di linearità rappresenta l'abilità di un metodo analitico di dare risposte direttamente proporzionali alla concentrazione di analita nel campione all'interno di un determinato range di azione detto, appunto, intervallo di linearità.

La correlazione tra la concentrazione e la risposta strumentale ottenuta per la molecola di interesse è stata determinata usando un modello di regressione lineare. A tal fine sono stati impiegati degli addizionati in matrice preparati per la retta di calibrazione; le analisi sono state ripetute in tre giorni diversi.

Per stabilire la validità della procedura impiegata è necessario calcolare anche il recupero che è un parametro che misura l'accuratezza del metodo, definita come

*“grado di accordo tra un risultato di un’analisi e il valore di riferimento accettato per la proprietà misurata”* (IUPAC, 2002). Non avendo la possibilità di disporre di materiali di riferimento certificati, la valutazione dell’accuratezza è stata effettuata mediante l’utilizzo di campioni addizionati e successiva valutazione del recupero percentuale; a questo scopo si sono condotte una serie di analisi su un pool di campioni di urina addizionati con tre diversi livelli di desametasone (0,25, 0,50 e 2,5 ng/ml); a ciascun campione è stato aggiunto lo standard interno (cortisolo-d4) ad una concentrazione pari a 2,5 ng/ml; per ciascun livello di concentrazione, sono state eseguite sei repliche in tre giorni diversi.

Il recupero è stato calcolato valutando la risposta ottenuta in termini di area, normalizzata per quella dello standard interno, e la concentrazione di desametasone relativa alla singola analisi è stata determinata sfruttando l’equazione della retta in matrice.

Il valore di concentrazione ottenuto rapportato alla quantità di standard addizionato e moltiplicato per cento restituisce il valore di recupero percentuale:

$$\text{recupero}\% = \frac{\text{conc}_{\text{trovata}} \left[ \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right]}{\text{conc}_{\text{teorica}} \left[ \frac{\text{ng}}{\text{ml}} \right]} \cdot 100$$

La ripetibilità è un parametro che descrive la precisione di un metodo analitico come *“grado di accordo tra i risultati di analisi indipendenti ottenuti in condizioni ben specificate”* (IUPAC, 2002). È stata definita mediante il calcolo della deviazione standard relativa (R.D.S.%) ottenuta in prove indipendenti effettuate nell’arco della stessa giornata e in giorni diversi per ottenere il valore di precisione intermedia.

Infine, nell’ambito della validazione del metodo, sono stati presi in considerazione altri due parametri: il LOD e il LOQ. Il primo rappresenta *“la più piccola concentrazione di analita nel campione su cui si effettua l’analisi che può essere significativamente distinta dallo zero”* (IUPAC, 2002); il secondo è *“la più piccola concentrazione di analita in un campione che può essere quantificata con un certo grado di accuratezza e precisione”* (Eurachem, 1998). Per il

desametasone, il LOD è stato calcolato come la media più tre volte la deviazione standard del *signal-to-noise*, ottenuto dall'analisi di 20 campioni di urina bianchi rappresentativi. Il LOQ, invece, è stato determinato, sempre su 20 campioni bianchi, come la media più dieci volte la deviazione standard del *signal-to-noise*. L'analisi di campioni addizionati al valore calcolato per il LOQ ha fornito una verifica sperimentale dell'adeguatezza del limite teorico.

### **3.5 ANALISI STATISTICA**

L'analisi statistica è stata effettuata mediante il software Windows Excel 2008.



## 4. RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 SVILUPPO E VALIDAZIONE DEL METODO

Nella prima parte del lavoro si è proceduto alla messa a punto del metodo. Lo standard puro in soluzione di lavoro, a concentrazione di 500 ng/ml, è stato iniettato a flusso costante, direttamente nello spettrometro di massa utilizzando una pompa siringa (infusione diretta); in questo modo è stato possibile verificare quali fossero le condizioni più favorevoli per il composto di interesse. Queste prove preliminari hanno permesso di confermare che, come riportato da diversi autori (Antignac *et al.*, 2000, Kim *et al.*, 1997), utilizzando nella fase mobile l'acido formico, si osserva la formazione di un addotto tra il desametasone e l'acido formico stesso che in modalità di ionizzazione negativa (ESI<sup>-</sup>) si deprotona molto bene, generando uno ione pseudo-molecolare molto stabile e abbondante. Impiegando l'addotto con il formiato  $[M+COOH]^-$ , m/z 437, come ione precursore per l'analisi in MS<sup>2</sup>, sono stati ottenuti due ioni prodotto: lo ione pseudo molecolare  $[M-H]^-$ , m/z 391, e il frammento  $[M-CH_2O-H]^-$ , m/z 361, derivante dal distacco del C21 della catena laterale con perdita di formaldeide (Antignac *et al.*, 2004) (Tabella 3).

Tabella 3: Pesì molecolari e ioni diagnostici dei corticosteroidi analizzati.

Composti	MW	P.I. (m/z)	C.E. MS <sup>2</sup>	P.I. MS <sup>2</sup> (m/z)	C.E. MS <sup>3</sup>	Ioni prodotti MS <sup>3</sup> (m/z)
Desametasone	392	437	15	361	20	292;307 <sup>b</sup> ;325;345 <sup>a</sup>
Cortisolo-d4 (IS)	364	411	12	335		

MW: peso molecolare      P.I.: ione precursore      C.E.: energia di collisione %

<sup>a</sup> ione quantificatore      <sup>b</sup> ione identificatore

Poichè lo ione  $[M-H]^-$  è risultato non essere specifico, lo ione  $[M-CHO-H]^-$  è stato usato come precursore per effettuare le analisi in  $MS^3$  in modo da avere almeno due ioni specifici e poter così avere una completa identificazione della molecola desiderata. Per effettuare le frammentazioni in  $MS^2$  e  $MS^3$  l'isolamento del precursore è stato settato a 1 m/z; gli ioni precursori, gli ioni prodotto e le energie di collisione sono riportati nella Tabella 3.

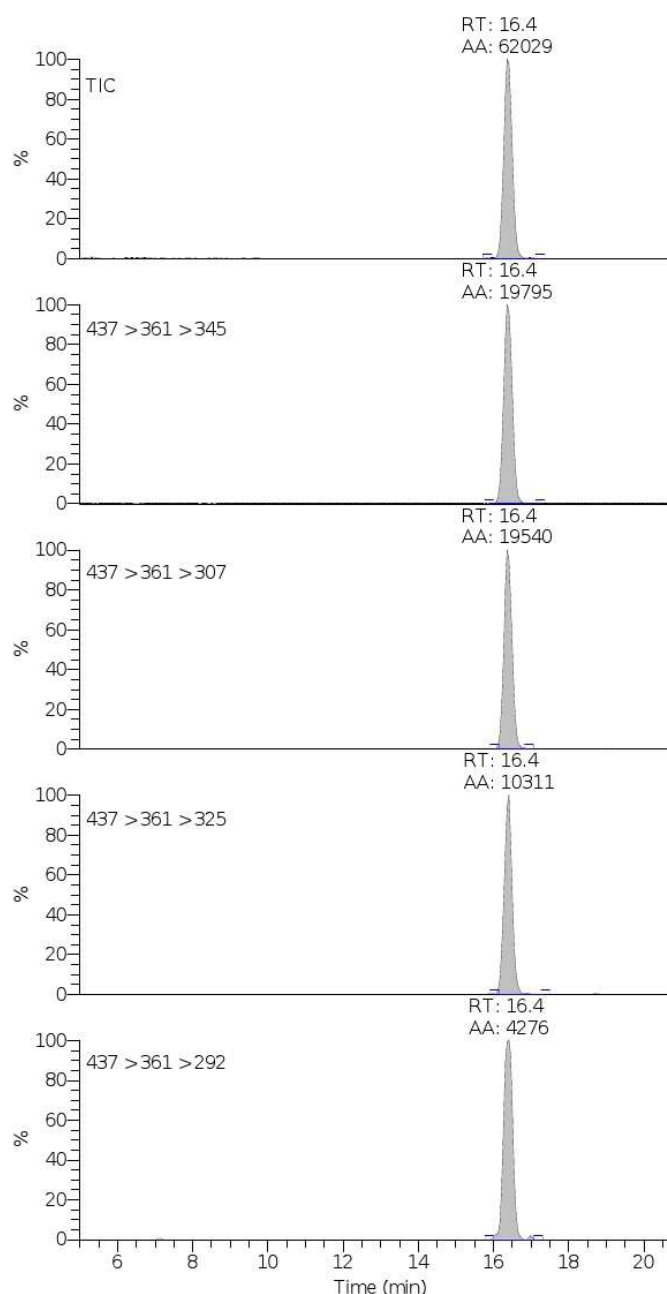


Figura 4: Cromatogrammi degli ioni diagnostici dello standard del desametasone (analisi in LC- $MS^3$ ).

Successivamente, lo standard è stato iniettato in colonna tramite l'autocampionatore. L'analisi dello standard del desametasone ha permesso di individuare il tempo di ritenzione dello stesso (Figura 4).

Il processo di validazione del metodo è consistito, in primo luogo, nell'analisi di 20 campioni bianchi di urina al fine di verificare l'assenza di composti che potessero agire come potenziali interferenti. La specificità della tecnica analitica impiegata è risultata essere molto soddisfacente poichè non è stata riscontrata la presenza di interferenti (Figura 7). La specificità del metodo adottato è stata verificata anche mediante l'analisi di una serie di campioni bianchi di urina a cui è stata addizionata una uguale concentrazione (2,5 ng/ml) di betametasone e desametasone. Questi corticosteroidi sono due epimeri e presentano lo stesso m/z e i medesimi ioni prodotto. Il metodo cromatografico utilizzato ha permesso di separare i picchi di questi due composti (Figura 5), infatti il tempo di ritenzione (RT) è 16,4 min per il desametasone e 15,9 min per il betametasone.

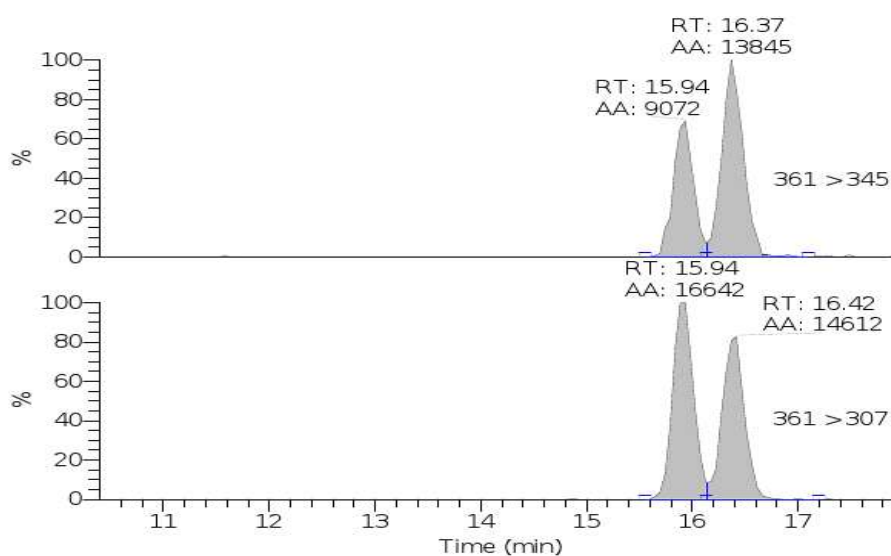


Figura 5: Cromatogrammi ottenuti da campioni di urina bianchi addizionati con 2,5 ng/ml di betametasone (tempo di ritenzione 15,9 minuti) e desametasone (tempo di ritenzione 16,4 minuti).

L'identificazione dell'analita (Tabella 4) è stata effettuata considerando:

- il tempo di ritenzione relativo;
- il rapporto tra i due ioni diagnostici scelti (derivanti dallo stesso ione precursore).

I valori di questi due parametri ottenuti dall'analisi dei campioni addizionati sono stati confrontati con quelli derivanti dall'analisi delle soluzioni standard.

Tutti i campioni addizionati sono rientrati negli intervalli di tolleranza richiesti come previsto dalla Decisione 2002/657/CE.

Tabella 4: Dati di conferma qualitativa del desametasone nei campioni di urina analizzati con LC/MS<sup>3</sup> nel corso delle prove di validazione.

Analita	RRT <sub>exp</sub>	RRT <sub>req</sub>	RRT <sub>pass</sub>	Ion ratio <sub>exp</sub>	Ion ratio <sub>req</sub>	Ion ratio <sub>pass</sub>
DEX	1,389	1,354-1,423	Sì	0,99	0,790-1,190	Sì

RRT: tempo di ritenzione relativo

Ion ratio: rapporto tra l'area degli ioni prodotto

exp: risultato ottenuto sperimentalmente

req: valore teorico richiesto

pass: accordato

La linearità è stata verificata nei campioni addizionati in un range di concentrazione di 0,1-10 ng/ml. Nell'intervallo considerato la linearità è mantenuta ed è rappresentata da un coefficiente di regressione lineare  $R^2 > 0,99$ .

La Figura 6 riporta un esempio di una retta di calibrazione in matrice.

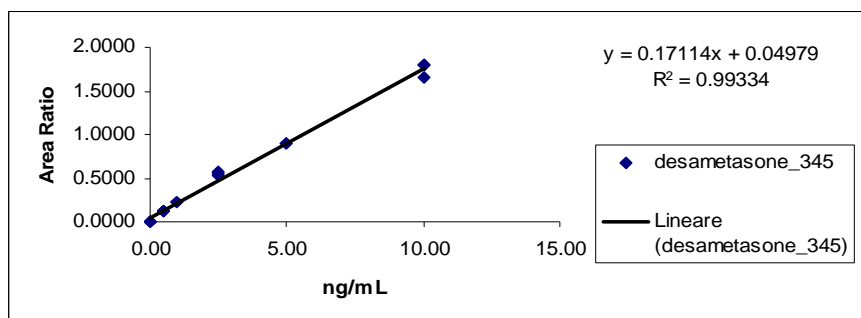


Figura 6: Retta di calibrazione in matrice.

Per la valutazione di accuratezza e precisione è stato utilizzato un pool di urine di animali di controllo. L'urina è stata addizionata con desametasone a tre livelli (0,25; 0,5; 2,5 ng/ml - 6 repliche per concentrazione) e le prove sono state ripetute in tre giorni diversi.

L'accuratezza è stata espressa in termini di recupero percentuale. Il valore di precisione intermedia considera la ripetibilità complessiva (espressa come deviazione standard relativa) di tutte le repliche analizzate. La Tabella 5 riassume i risultati ottenuti.

Tabella 5: Performance del metodo per la determinazione del desametasone nelle urine mediante LC-MS<sup>3</sup> (n=18 per ciascuna concentrazione).

Parametri	Desametasone		
Concentrazione desametasone (ng/ml)	0,25	0,50	2,50
Precisione intermedia (R.S.D. %)	9,30	9,80	5,60
Recupero (%)	89	92	110
Linearità ( $R^2$ , 0,10-10 ng/ml)		0,997	
LOD (ng/ml)		0,15	
LOQ (ng/ml)		0,25	

Il metodo proposto presenta un buon grado di recupero e di precisione; il LOQ stabilito è adeguato allo scopo che questa tesi si propone.

Nelle Tabelle 6, 7, 8 sono riportati in esteso i risultati ottenuti nelle prove di validazione del metodo. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad una analisi statistica mediante la tecnica dell'analisi della varianza (ANOVA) ad una via per verificare l'effetto del fattore "giorno di analisi".

La Tabella 9 riassume i risultati dell'analisi statistica effettuata. Dato che il valore di F calcolato è minore di F critico per tutti e tre i livelli di concentrazione e il valore di P è maggiore di 0.05 è possibile affermare che i valori medi ottenuti nei diversi giorni di analisi non sono significativamente diversi tra loro e quindi il fattore "giorno di analisi" è trascurabile nel determinare la variabilità del dato sperimentale.

Tabella 6: Risultati delle analisi degli addizionati a 0,25 ng/ml: recupero percentuale e RSD%.

LIVELLO FORTIFICAZIONE 0,25 ng/mL

	giorno 1	giorno 2	giorno 3
replica 1	0,19	0,22	0,21
replica 2	0,20	0,24	0,24
replica 3	0,21	0,21	0,26
replica 4	0,21	0,23	0,22
replica 5	0,24	0,21	0,27
replica 6	0,22	0,23	0,22
media (ng/ml)	0,21	0,23	0,23
SD	0,02	0,01	0,02
RSD %	8,4	6,0	9,7
recupero %	84	90	94

Within Day RSD % 8,2  
Between Day RSD % 4,3  
Precisione intermedia RSD % 9,3  
Recupero complessivo % 89

Tabella 7 Risultati delle analisi degli addizionati a 0,50 ng/ml: recupero percentuale e RSD%.

LIVELLO FORTIFICAZIONE 0,50 ng/mL

	giorno 1	giorno 2	giorno 3
replica 1	0,44	0,40	0,41
replica 2	0,41	0,52	0,48
replica 3	0,48	0,50	0,44
replica 4	0,44	0,47	0,46
replica 5	0,41	0,51	0,39
replica 6	0,48	0,52	0,52
media (ng/ml)	0,44	0,49	0,45
SD	0,03	0,05	0,05
RSD %	7,1	9,5	10,5
recupero %	89	97	90

Within Day RSD % 9,2  
Between Day RSD % 3,4  
Precisione intermedia RSD % 9,8  
Recupero complessivo % 92

Tabella 8: Risultati delle analisi degli addizionati a 2,50 ng/ml: recupero percentuale e RSD%.

LIVELLO FORTIFICAZIONE 2,50 ng/mL

	giorno 1	giorno 2	giorno 3
replica 1	3,10	2,73	2,65
replica 2	2,80	2,79	2,72
replica 3	2,90	2,68	2,70
replica 4	3,00	2,84	2,76
replica 5	2,70	2,93	2,74
replica 6	2,90	3,20	2,70
media (ng/ml)	2,90	2,86	2,71
SD	0,14	0,19	0,04
RSD %	4,9	6,5	1,5
recupero %	116	114	109

Within Day RSD % 5,0  
Between Day RSD % 2,6  
Precisione intermedia RSD % 5,6  
Recupero complessivo % 113

Tabella 9: Riassunto risultati dell'analisi della varianza ( $\alpha=0,05$ ).

livello addizionati	F critico	F calcolato	P-value
0.25 ng/ml	3,6823	2,6758	0,1014
0.50 ng/ml	3,6823	1,8238	0,1954
2.50 ng/ml	3,7389	2,5742	0,1117

## 4.2 RISULTATI DEL PIANO SPERIMENTALE

Il metodo analitico in LC-MS<sup>3</sup> utilizzato ha permesso di determinare, tramite analisi quantitativa, la concentrazione urinaria del desametasone nell'urina degli animali trattati. Nella Figura 7 si evidenzia come l'applicazione del metodo proposto permetta di discriminare tra animali trattati e animali controllo.

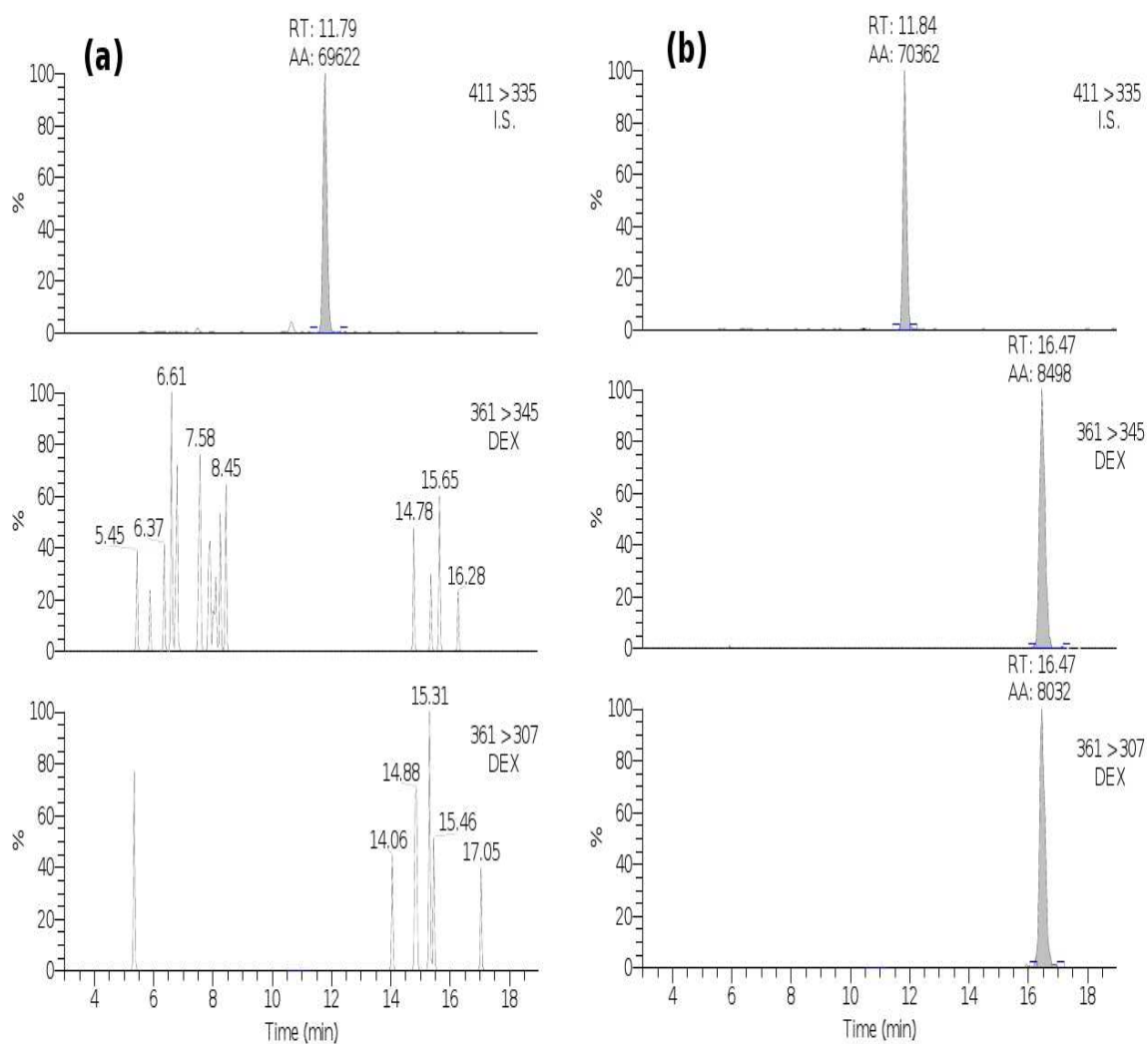


Figura 7: Cromatogrammi degli ioni diagnostici ottenuti da un campione di urina da animale controllo (a) e da animale trattato (b).



Il metodo di analisi sviluppato è stato applicato a tutti i campioni di urina prelevati nell'ambito del piano sperimentale che ha previsto il trattamento con desametasone, come riportato nella sezione “materiali e metodi”.

I risultati ottenuti dalle analisi sono riportati nella Tabella 10.

Tabella 10: Valori di desametasone (ng/ml) rilevati negli animali controllo (K) e trattati (T).

<b>Animali/ Giorno di prelievo</b>	<b>d0 (ng/ml)</b>	<b>d19 (ng/ml)</b>	<b>d43 (ng/ml)</b>	<b>d45 (ng/ml)</b>	<b>d47 (ng/ml)</b>
<b>K7</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
<b>K8</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
<b>K9</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
<b>K10</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
<b>K11</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
<b>K12</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
<b>K23</b>	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
<b>K24</b>	n.d.	n.d.	n.d.	-	n.d.
<b>T1</b>	n.d.	n.d.	1,09	0,7	-
<b>T2</b>	n.d.	3,09	5,05	0,4	-
<b>T3</b>	n.d.	2,08	2,08	0,3	-
<b>T4</b>	n.d.	2,08	3,03	n.d.	-
<b>T5</b>	n.d.	4,04	2,05	n.d.	-
<b>T6</b>	n.d.	2,01	2,01	0,8	-
<b>T19</b>	n.d.	2,00	2,06	-	n.d.
<b>T20</b>	n.d.	1,03	1,04	-	n.d.

D: giorno K: animale controllo T: animale trattato n.d.: non determinato.

Nelle urine raccolte dagli animali appartenenti al gruppo di controllo e in quelle dei soggetti trattati non sono stati identificati residui di desametasone prima dell'inizio del trattamento. Nei campioni prelevati il giorno 19 e il giorno 43 della sperimentazione dai soggetti a cui è stato somministrato il farmaco per os la concentrazione media di desametasone misurata è stata di 2,5 ng/ml (Figura 8).

Due giorni dopo la sospensione del trattamento, cioè il giorno 45, in seguito alla raccolta dell'urina mediante cistocentesi effettuata al macello, in tutti i campioni sono stati individuati residui dello xenobiotico nella matrice biologica da noi scelta, ma solamente quattro dei sei animali sacrificati presentavano una quantità del composto oggetto di studio al di sopra del LOD (0,15 ng/ml) (Tabella 10). Infine, un ulteriore prelievo effettuato quattro giorni dopo il termine della somministrazione (d47) ha rilevato la scomparsa completa della molecola nell'urina degli animali trattati (due animali).

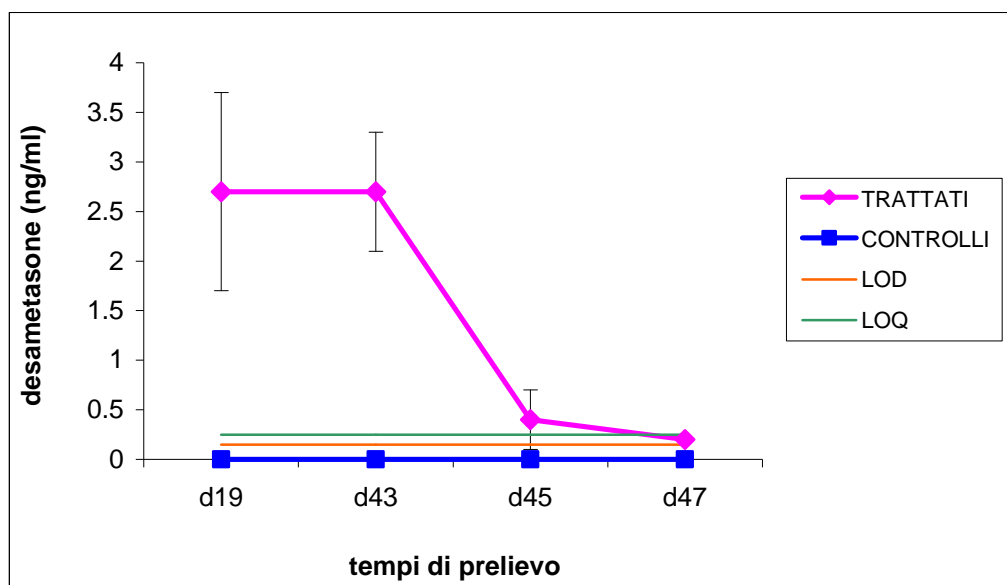


Figura 8: Valori medi (ng/ml) di eliminazione urinaria del desametasone nei due gruppi.

Studi sperimentali hanno acclarato che il desametasone viene metabolizzato a livello epatico e che la sua biotrasformazione porta alla formazione principalmente di composti ossidati o coniugati con solfato o acido glucuronico (Antignac *et al.*, 2002).

Nell'ambito del nostro studio, la ricerca dei composti derivanti dalle biotrasformazioni epatiche di Fase II è stata effettuata sottoponendo i campioni di urina da analizzare ad una deconiugazione mediante il trattamento con un enzima. In particolare, tutti i campioni di urina sono stati analizzati con o senza

deconiugazione mediante l'enzima  $\beta$ -glucuronidasi. Quest'ultimo (che presenta attività anche come sulfatasi) è ricavato dal gasteropode *Helix Pomatia* ed è in grado di scindere gli analiti dai loro coniugati ottenendo così la forma libera di tali composti. L'impiego del suddetto catalizzatore biologico ci ha consentito di stimare, in modo indiretto, la quota di desametasone coniugato pur non avendo a disposizione lo standard del composto coniugato. I dati ottenuti (Figura 9) al riguardo mettono in luce come, in corso di somministrazione di desametasone per os come promotore di crescita, l'85% del farmaco venga eliminato in forma libera.

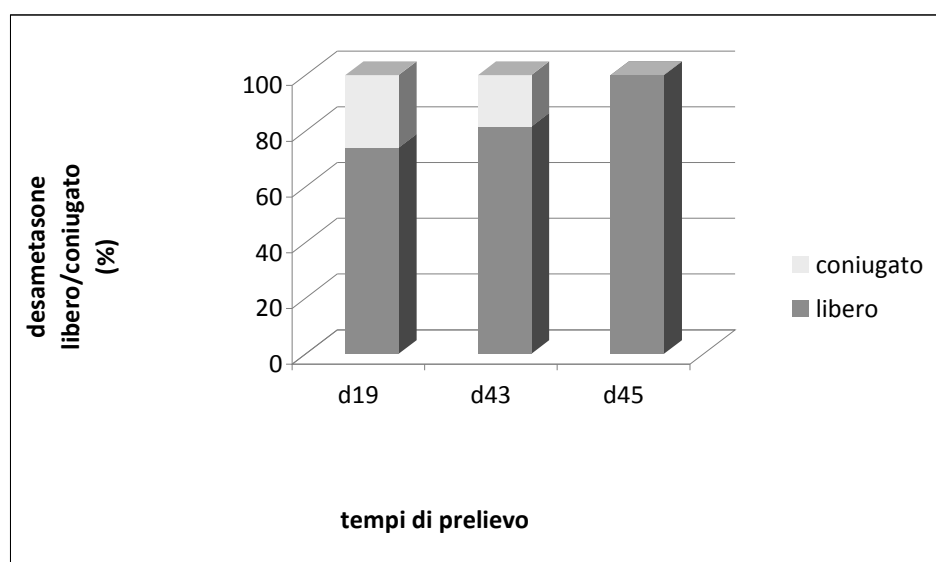


Figura 9: Rapporto percentuale tra desametasone libero e coniugato.

La ricerca dei metaboliti di Fase I è stata effettuata, da un punto di vista qualitativo, mediante una ricerca mirata di quelli che abbiamo ipotizzato potessero essere i principali composti di interesse, tenendo in considerazione quelle che sono le reazioni più frequenti (idrossilazione, ossidazione e riduzione). Nella Tabella 11 sono riportati gli  $m/z$  degli ioni monitorati come precursori dei possibili metaboliti e la loro più probabile frammentazione in  $MS^2$

Tabella 11: Ricerca mirata dei principali metaboliti di Fase I del desametasone.

	modifica strutturale	differenza di massa (Da)	ione precursore [M+CHOOH-H] <sup>+</sup> (m/z)	ione prodotto [M-CH <sub>2</sub> O-H] <sup>+</sup> (m/z)
DEX			437	361
	- H <sub>2</sub>	- 2	435	359
	+ O	+ 16	453	377
	+ 2 H <sub>2</sub> + O	+ 20	457	381
	+ H <sub>2</sub>	+ 2	439	363
	+ 2 H <sub>2</sub>	+ 4	441	365

Nelle urine degli animali trattati con desametasone è stato rilevato un metabolita idrossilato che ipotizziamo possa corrispondere al 6β-OH-desametasone (Figure 10 e 11). Non avendo a disposizione lo standard puro di questo analita le analisi effettuate sono state solo di tipo qualitativo.

In assenza di una analisi quantitativa, non è stato possibile confrontare la concentrazione urinaria del metabolita idrossilato con quella del desametasone; prendendo in considerazione la risposta strumentale ottenuta (in termini di rapporto tra area dell'analita e area dello standard interno) si evidenzia come l'intensità del segnale del metabolita sia inferiore a quella del desametasone. La cinetica di eliminazione del metabolita identificato è sovrapponibile a quella del composto parent; dopo quattro giorni dalla sospensione del trattamento il metabolita idrossilato non è più rilevabile nelle urine.

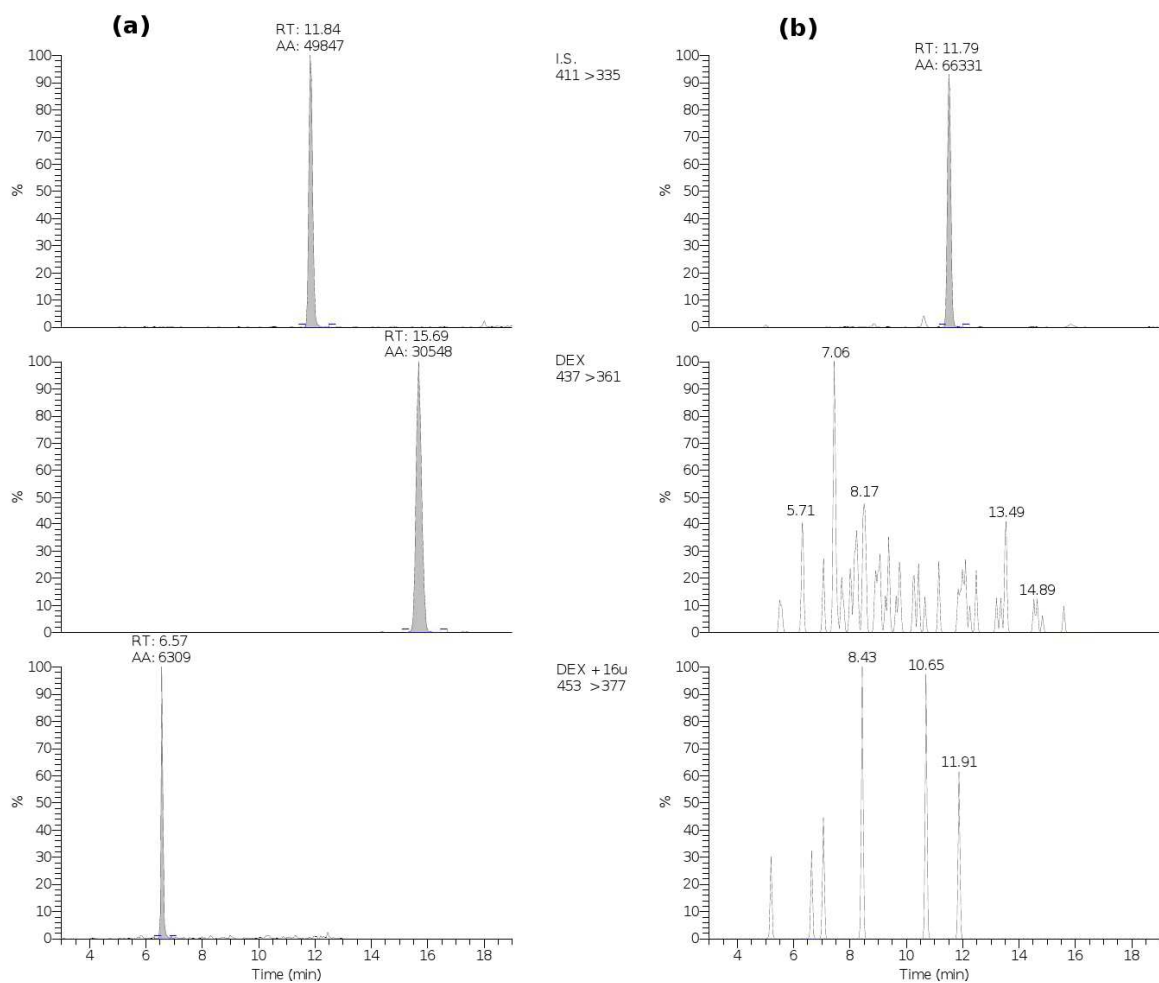


Figura 10: Cromatogrammi degli ioni diagnostici ottenuti per il desametasone e per il suo idrossilato dall'urina di animali controllo **(b)** e di animali trattati **(a)**.

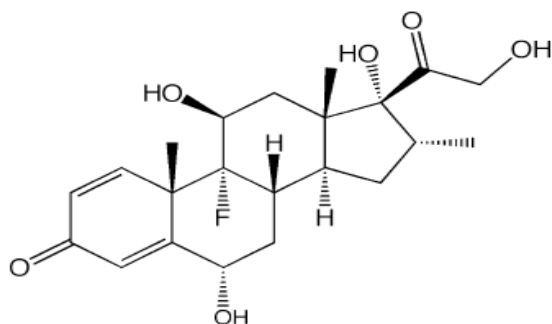


Figura 11: Struttura chimica del 6 $\beta$ -OH-desametasone.

Il nostro lavoro conferma, quindi, le informazioni riguardanti la cinetica di eliminazione urinaria del desametasone.

I dati in letteratura indicano che, sia quando il composto è utilizzato come promotore di crescita sia in caso di uso a dosi terapeutiche, il desametasone si ritrova, prevalentemente, in forma libera e solamente il 3-20% è rappresentato dai metaboliti di Fase II (Antignac *et al.*, 2002; Vincenti *et al.*, 2009).

La velocità di eliminazione urinaria è piuttosto elevata, indipendentemente dalla via di somministrazione usata; ad esempio, in un bovino adulto trattato con un'unica dose di desametasone sodio fosfato per via i.m., le concentrazioni dello stesso nell'urina diminuiscono rapidamente da 146 ng/ml dopo due giorni dal trattamento a 19,7 ng/ml dopo sette giorni, fino a scendere sotto i livelli di rilevanza dopo undici giorni (Bagnati *et al.*, 1996). Anche dopo somministrazione ripetuta (quattro iniezioni a distanza di una settimana) per via i.m. di una associazione di desametasone sodio fosfato (50 mg/capo) e di 19-nortestosterone (300 mg/capo) in un gruppo di vitelloni di entrambi i sessi, si è notata la rapida velocità di escrezione urinaria con valori inferiori ai limiti di rilevanza dopo nove giorni dall'ultimo trattamento (Calvarese *et al.*, 1994).

Nel caso della somministrazione per os, che sembra essere la via d'elezione nel trattamento illecito dei bovini a fine finissaggio, come dimostrato dal ritrovamento di basse dosi di desametasone nei mangimi (0,1-0,5 ppm), la velocità di eliminazione è altrettanto rapida. Vincenti (Vincenti *et al.*, 2009) ha dimostrato che nelle urine degli animali trattati con una dose orale pari a 1,4 mg/die o 0,7 mg/die di desametasone, la concentrazione del glicocorticoide diminuisce progressivamente durante il trattamento fino ad arrivare a valori attorno ai 2 ng/ml al giorno 53 e 25 di trattamento, rispettivamente; negli animali sottoposti al dosaggio minore del farmaco, il livello della molecola nelle urine è sceso al di sotto di 0,2 ng/ml sette giorni dopo il termine della somministrazione.

Un tale pattern di eliminazione urinaria era già stato rilevato in un bovino sottoposto all'assunzione orale di desametasone alla dose di 50 mg/die per un periodo complessivo di sette giorni (Courtheyn *et al.*, 1994): la concentrazione in tale matrice era rimasta costante per i primi quattro giorni di trattamento ma nei successivi tre giorni aveva subito un rapido decremento fino a raggiungere valori di un centinaio di volte inferiori non appena sospesa la somministrazione.

I risultati da noi ottenuti sull'elevata velocità di eliminazione urinaria del desametasone nella specie bovina dopo la sospensione del trattamento trovano conferma anche nello studio condotto da Ferranti (Ferranti *et al.*, 2011): dopo un giorno dalla sospensione del protocollo stabilito la concentrazione urinaria della molecola era vicino a 1 ng/ml; dopo cinque giorni tale valore si era dimezzato e il desametasone era stato ritrovato solo in cinque dei dieci campioni di urina che erano stati sottoposti ad analisi; infine, dopo dieci giorni, non era stata riscontrata alcuna traccia di residui negli animali trattati. Anche Canizzo (Canizzo *et al.*, 2011) avvalorata la tesi del basso tasso di escrezione del desametasone nel caso in cui questo venga impiegato in un piano di trattamento come promotore di crescita: i livelli del farmaco sono risultati al di sotto dei limiti stabiliti utilizzando la LC-MS in circa un terzo dei campioni analizzati.

Tutti gli studi riportano un marcato decremento della concentrazione urinaria di questo corticosteroide sintetico già nei giorni immediatamente successivi alla somministrazione dello stesso, indipendentemente dalla via utilizzata. La maggior parte del desametasone, anche quando somministrata per via orale, viene eliminata nelle urine nei primi 3-4 giorni, mentre dal quinto giorno la concentrazione si riduce. Da varie trattazioni si evidenzia che le diverse condizioni fisiologiche e anche patologiche degli animali trattati sono causa di elevata variabilità dei livelli del farmaco riscontrati nelle diverse matrici biologiche. I fattori che possono giocare un ruolo importante nel definire il profilo urinario del desametasone sono rappresentati dalla distanza del prelievo, dal momento della somministrazione, dalla disponibilità di acqua di abbeverata, dalla quantità di urina prodotta e dalle diverse condizioni metaboliche. Alla luce di tutto ciò, è possibile che i ridotti livelli urinari del farmaco immodificato, rilevati quando questo viene impiegato in modo illecito, siano imputabili non solo alle basse dosi di partenza impiegate ma anche ai fenomeni di poliuria e polidipsia che si manifestano.

Relativamente alle reazioni di Fase II, il rapporto tra la quota di desametasone libero e quello coniugato (Figura 9) si assesta intorno a valori che trovano riscontro positivo in altre trattazioni quali quella proposta da Antignac (Antignac *et al.*, 2002). Tale studio ha come finalità quella di indagare, sempre mediante HPLC-MS/MS, il metabolismo di Fase II dei corticosteroidi in modo tale da

migliorare l'efficienza e la specificità dei controlli sul loro impiego negli animali. La metodica sviluppata è stata applicata per determinare le proporzioni relative esistenti tra corticosteroidi liberi e coniugati nell'urina bovina dopo somministrazione di desametasone acetato (40 mg all'animale 1) e desametasone fosfato (all'animale 2) mediante iniezione intramuscolare. Un giorno dopo il trattamento la quota di farmaco immodificato rilevato è stata del 96,1% nell'animale 1 e del 72,9% nell'animale 2; tali valori percentuali rispecchiano, dunque, i risultati ottenuti nel nostro piano sperimentale di trattamento. Ad una conclusione simile è giunto anche Vincenti (Vincenti *et al.*, 2009) sia trattando un gruppo di bovini con elevate dosi di desametasone (60 µg/Kg) per tre giorni consecutivi, sia trattando con una piccola quantità giornaliera di glicocorticoidi (0,7 o 1,4 mg per ciascun animale) per un periodo prolungato (60 giorni).

Per quanto concerne i metaboliti di Fase I, dai cromatogrammi ottenuti dai campioni da noi esaminati è emersa la presenza di un metabolita idrossilato del desametasone, che abbiamo ipotizzato possa corrispondere al 6β-OH desametasone. La presenza di metaboliti di Fase I del desametasone era stata precedentemente già studiata nel bovino (Antignac *et al.*, 2004), nel cammello (Al Katheeri *et al.*, 2006) e nell'uomo (Gentile *et al.*, 1996). Dopo somministrazione i.m., Antignac (Antignac *et al.*, 2004) ha dimostrato mediante LC-MS<sup>2</sup> la presenza di otto metaboliti di Fase I del desametasone nelle urine del bovino di cui due derivavano da reazioni di idrossilazione, uno era ridotto e cinque ossidati.

Questi risultati sono confermati anche dal lavoro proposto da Vanhaecke (Vanhaecke *et al.*, 2011) sulla cinetica di eliminazione del desametasone in diverse matrici biologiche (urina, feci e pelo) in seguito ad una singola somministrazione di desametasone acetato ed esteri fosfati.

Prove sperimentali *in vivo* e *in vitro* sono state condotte anche nel cammello sempre con l'obiettivo di identificare i metaboliti del desametasone: Al Katheeri ha proposto un lavoro (Al Katheeri *et al.*, 2006) in cui due soggetti maschi di quattro anni sono stati trattati per via endovenosa con un bolo di farmaco pari a 0,2 mg/kg. Successivamente sono stati effettuati dei campionamenti di urina a diversa distanza di tempo dalla somministrazione. Dall'analisi mediante LC-



MS/MS sono stati individuati due metaboliti di Fase I, derivanti da reazioni di riduzione e idrossilazione. Inoltre, è stato rilevato anche un processo biotrasformativo di glucuronazione a carico sia dei metaboliti di Fase I sia del composto progenitore.

Nel nostro lavoro si è dimostrata per la prima volta la presenza di metaboliti di Fase I a seguito di un trattamento a dosi non terapeutiche. Una possibile spiegazione di ciò potrebbe essere che il trattamento prolungato degli animali *per os* con il farmaco porti ad un incremento dell'attività degli enzimi epatici coinvolti nel metabolismo di Fase I. I nostri risultati indicano comunque che il composto parent sia comunque da ritenere un marker più efficace per identificare un eventuale trattamento.

## 5. CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dalle analisi effettuate in LC-MS<sup>3</sup> hanno confermato quanto viene riportato da altri autori sulla cinetica di eliminazione urinaria del desametasone nel bovino; questo composto, quando impiegato come promotore di crescita, è presente nelle urine principalmente in forma immodificata e la sua escrezione è solo debolmente influenzata dai processi biotrasformativi epatici. Vista la notevole rapidità di eliminazione urinaria e i bassi dosaggi impiegati nel caso di trattamenti fraudolenti, l'identificazione dei soggetti positivi risulta essere molto difficoltosa.

I resoconti delle indagini ufficiali condotte nell'Unione Europea sostengono che le percentuali di positività ai composti usati in modo illecito quali promotori di crescita (steroidi sessuali,  $\beta$ -agonisti e corticosteroidi) sono del tutto trascurabili in quanto nettamente inferiori all'1%. In realtà, i dati concernenti i sequestri di preparazioni clandestine e i risultati delle analisi istopatologiche condotte sugli organi bersaglio in sede di macellazione hanno evidenziato una diffusione molto più vasta del problema. Poiché i trattamenti illeciti nel bovino e, in generale, negli animali destinati al consumo umano rappresentano una questione di notevole gravità soprattutto in termini di tutela della salute pubblica è necessario, dunque, potenziare l'azione degli organi di controllo mediante lo sviluppo di metodiche analitiche più valide.

In particolare, alla luce dei dati evidenziati nella presente trattazione, nel caso del desametasone, la scelta di fissare il *cut-off* dei metodi ELISA utilizzati per lo screening nell'urina ad un valore pari a 2 ng/ml, si rivela inadeguata a identificare gli animali sottoposti ad un eventuale trattamento con dosi non terapeutiche. In questo contesto, l'adozione della spettrometria di massa in combinazione con la cromatografia liquida (LC-MS) garantirebbe una maggiore efficacia dell'attività di sorveglianza.

E' doveroso sottolineare che esistono alcune oggettive difficoltà nell'attuazione di piani di controllo basati sull'impiego, come tecnica di screening, della LC-MS. I principali ostacoli sono rappresentati dall'elevato costo e dai lunghi tempi di esecuzione. Nonostante ciò, questo approccio è, ad oggi, l'unico che possa

garantire risultati soddisfacenti per contrastare più efficacemente le nuove strategie di trattamento illegale degli animali destinati al consumo umano.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Abraham G., Gottschalk J., Ugemach F.R. (2004) Possible role of dexamethasone in sensitizing the beta-adrenergic receptor system in vivo in calves during concomitant treatment with clenbuterol. *Pharmacology*, 72: 196-204

Al Katheeri N.A., Wasfi I.A., Lambert M., Giuliano Albo A., Nebbia C. (2006) In vivo and in vitro metabolism of dexamethasone in the camel. *The Veterinary Journal*, 172: 532-543

Anderson B.H., Watson D.L., Colditz I.G. (1999) The effect of dexamethasone on some immunological parameters in cattle. *Veterinary Research Communication*, 23: 399-413

Antignac J.P., Brosseaud A., Gaudin-Hirret I., André F., Bizec B.L., (2005) Analytical strategies for the direct mass spectrometric analysis of steroid and corticosteroid phase II metabolites. *Steroids*, 70: 205-216

Antignac J.P., Le Bizec B., Monteau F., André F. (2002) Study of natural and artificial corticosteroid phase II metabolites in bovine urine using HPLC-MS/MS. *Steroids*, 67: 873-882

Antignac J.P., Le Bizec B., Monteau F., Poulain F., André F. (2000) Collision-induced dissociation of corticosteroids in electrospray tandem mass spectrometry and development of a screening method by high mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 14: 33-39

Antignac J.P., Monteau F., Negriolli J., André B., Le Bizec B. (2004) Application of Hyphenated Mass Spectrometric Techniques to the Determination of Corticosteroid Residues in Biological Matrices. *Chromatographia*, 59: S13-S22

Badino P., Re G. (2009) Glicocorticoidi. In: Farmacologia Veterinaria, Ed. Carli S., Ormas P., Re G., Soldani G., 651-663, IDELSON-GNOCCHI, Napoli

Bagnati R., Ramazza V., Zucchi M., Simonella A., Leone F., Bellini A., Fanelli (1996) Analysis of Dexamethasone and Betamethasone in Bovine Urine by Purification with an "On-Line" Immunoaffinity Chromatography-High-Performance Liquid Chromatography System and Determination by Gas chromatography-Mass Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 235: 119-126

Barret Y.C., Akinsanya B., Chan S-Y., Vesterqvist O. (2005) Automated on-line SPE LC-MS-MS method to quantitate 6beta-hydroxycortisol to cortisol ratio as an indicator of CYP3A activity. *Journal of Chromatography B*, 821: 159-165

Biolatti B. (2009) Lesioni indotte dai promotori di crescita illeciti negli animali da carne. In: Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali. ED: Nebbia C., pp 321-353, EdiSES, Napoli

Canizzo F.T., Capra P., Divari S., Ciccotelli V., Biolatti B., Vincenti M. (2011) Effects of low-dose dexamethasone and prednisolone long term administration in beef calf: Chemical and morphological investigation. *Analytica Chimica Acta*, 700: 95-104

Calvarese S., Rubini P., Urbani G., Ferri N., Ramazza V., Zucchi M. (1994) Experimental administration of 19-nortestosterone and dexamethasone in cattle: elimination of the two drugs in different biological matrices. *Analyst*, 119: 2611-2615

Corah T., Tantum J., Morgan J., Mortimer R., Smith G. (1995) Effects of a dexamethasone implant on deposition of intramuscular fat in genetically identical cattle. *Journal on Animal Science*, 73: 3310-3316

Courtheyn D., Le Bizec B., Brambilla G., De Brabander H.F., Cobbaert E., Van de Wiele M., Vercammen J., De Wasch K. (2002) Recent developments in the use and abuse of growth promoters. *Analitica Chimica Acta*, 473: 71-82

Courtheyn D., Vercammen J., De Brabander H., Vandenreyt I., Batjoens P., Vanoosthuyze K., Van Peteghem C. (1994) Determination of dexamethasone in urine and faeces of treated cattle with negative chemical ionization-mass spectrometry. *Analyst*, 119: 2557-2564

Daeseleire E., De Guesquire A., Van Peteghem C. (1993) Metabolism of 17 $\beta$ ,19-nortestosterone in urine of calves after oral intake and intramuscular administration. *Analytica Chimica Acta*, 275: 95-103

Debenedetti A. (2006) Endocrinologia. In: *fisiologia degli animali domestici con elementi di etologia*. Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F., UTET, Torino, pp 723-742

De Brabander H.F., Poelmans S., Schilt R., Stephany R.W., Le Bizec B., Draisci R., Sterk S.S., Van Ginkel L.A., Courthney D., Van Hoof N., Macri A., De Wasch K. (2004) Presence and metabolism of the anabolic steroid boldenone in various animal species: a review. *Food Additives and Contaminants*, 21: 515-525

De Wasch K., De Brabander H., Courtheyn D. (1998) Detection of corticosteroids in injection sites and cocktails by MS<sup>n</sup>. *Analyst*, 123: 2409-2414

EURACHEM (1998) The fitness for purpose of analytical methods-A laboratory guide to method validation and related topics. *Eurachem*, pag.19

Ferranti C., Quadri F.D., Palleschi L., Marchifava C., Pezzolato M., Bozzetta E., Caramelli M., Draisci R. (2011) Studies on the presence of natural and synthetic corticosteroids in bovine urine. *Steroids*, 76: 616-625

Ferguson D.C., Hoening M. (1999) Glicocorticoidi, mineralcorticoidi ed inibitori della sintesi di steroidi. In *Farmacologia e terapeutica veterinaria*. Ed. Adams H.R., EMSI, Roma, pp 622-637

Gentile D.M., Tomlinson E.S., Maggs J.L., Park B.K., Back D.J. (1996) Dexamethasone metabolism by human liver in vitro. Metabolite identification and inhibition of 6-hydroxylation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 277: 105-112

Giorgino F., Smith R. (1995) Dexamethasone enhances insulin-like growth factor-I effects on skeletal muscle cell proliferation. Role of specific intracellular signaling pathways. *Journal of Clinical Investigation*, 96: 1473-1483

Girolami F., Donalisio C., Tagliante M., Gatto S., Bertarelli D., Balbo A., Carletti M., Gardini G., Barbarino G., Nebbia C. (2010) Illicit use of dexamethasone in meat cattle: rationale. Effects on treated animals, and traditional and innovative diagnostic techniques. *Large Animal Review* Volume 16, 3: 113-124

Gordon D.B: (1994) Tecniche di spettrometria di massa in Metodologia biochimica a cura di K. Wilson e J. Walzer, Raffaello Cortina Editore, IV edizione , Milano

Gottardo F., Brscic M., Pozza G., Ossensi C., Contiero B., Marin A., Cozzi G. (2008) Administration of dexamethasone per os in finishing bulls. **I.** Effects on productive traits, meat quality and cattle behaviour as indicator of welfare. *Animal*, 2: 1073-1079

Greco D., Stabenfeldt G.H. (2002) Endocrinology. In *Textbook of Veterinary Physiology*, Ed. Cunningham J.G., 3<sup>rd</sup> ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, P.A., pp.323-372

International Union Of Pure And applied Chemistry (IUPAC) (2002) Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. (IUPAC Technical Report) *Pure and Applied Chemistry*, 74(5): 835-855

Illera J.C., Pena L., Martínez-Mateos M.M., Camacho L., Blass A., Garcia-Partida P., Illera M.J., Silvan G. (2007) The effect of long- term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 2. Adrenal morphology (histopathology and immunochemical studies) *Analytica Chimica Acta*, 586: 252-258

Isaia Martina (2010) Messa a punto di un metodo in HPLC-MS-MS per la ricerca di corticosteroidi naturali nell'urina bovina. Tesi di laurea

Kim Y., Kim T., Lee W. (1997) Detection of corticosteroids in the presence of organic acids in a liquid chromatography eluent using the negative-ion mode of thermospray mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11: 863

Nebbia C. (2009) Corticosteroidi. In *Residui di farmaci e contaminanti ambientali nelle produzioni animali*. Ed. Nebbia C., EdiSES, Napoli, pp 285-295

Nebbia C., Dacasto M., Rossetto Giaccherino A., Giuliano Albo A., Carletti M. (2003) Comparative expression of liver cytochrome P450-dependent monooxygenases in the horse and in other agricultural and laboratory species. *The Veterinary Journal*, 165: 53-54

Odore R., Badino P., Barbero R., Cuniberti B., Pagliasso S., Girardi C., Re G. (2007) Regulation of tissue beta-adrenergic, glucocorticoid and androgen receptors induced by repeated exposure to growth promoters in male veal calves. *Research in Veterinary Science*, 83: 227-233

Poelmans S., De Wasch K., Noppe H., Van Hoof N., Van Cruchten S., Le Bizec B., Deceuninck Y., Sterk S., Van Rossum H.J., Hoffman M.K., De Brabander



H.F. (2005) Endogenous occurrence of some anabolic steroids in swine matrices. *Food Additives and Contaminants*, 22: 808-815

Schimmer B.P., Parker K.L. (2001) Adrenocorticotrophic hormone; adrenocortical steroids and their synthetic analogs; inhibitors of the synthesis and action of adrenocortical hormones. In *Goodman & Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics 11<sup>th</sup> Ed.* Ed. Brunton L., Lazo J., Parker K.L., McGraw Hill, New York, pp 1459-1485

Silvan G., Martínez-Mateos M.M., Blass A., Camacho L., Gonzales-Gil A., Garcia-Partida P., Illera J.C. (2007) The effect of long-term exposure to combinations of growth promoters in Long Evans rats: part 1: Endocrine adrenal function. *Analytica Chimica Acta*, 586: 246-251

Skrabalak D.S., Maylin G.A. (1982) Dexamethasone metabolism in the horse. *Steroids*, 39: 233-244

Soma L.R., Uboh C.E., Luo Y., Guan F., Moate P.J., Boston R.C. (2005) Pharmacokinetics of dexamethasone with pharmacokinetics/pharmacodynamic model of the effect of dexamethasone on endogenous hydrocortisone and cortisone in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 28: 71-80

Tarantola M., Schiavone A., Preziuso G., Russo C., Biolatti B., Bergero D. (2004) Effects of low doses of dexamethasone on productive traits and meat quality of veal calves. *Animal Science*, 79: 93-98

Tomlinson E.S., Maggs J.L., Park B.K., Back D.J. (1997 a) Dexamethasone metabolism in vitro: species differences. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 62: 345-352

Van den Hauwe O., Dumoulin F., Elliott C., Van Peteghem C. (2005 b) Detection of synthetic glucocorticoid residues in cattle tissue and hair samples after a

single dose administration using LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 817: 215-223

Van den Hauwe O., Schneider M., Sahin A., Van Peteghem C.H., Naegeli H. (2003) Immunochemical screening and liquid chromatographic-tandem mass spectrometric confirmation of drug residues in edible tissues of calves injected with a therapeutic dose of the synthetic glucocorticoids Dexamethasone and Flumethasone. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 326-330

Vanhaecke L., Antignac J.P., Courtheyn D., Le Bizec B., De Brabander H. (2011) Elimination kinetics of dexamethasone in bovine urine, hair and feces following single administration of dexamethasone acetate and phosphate esters. *Steroids*, 76: 111-117

Van Puymbroeck M., Kuilman M.E.M., Maas R.F.M., Witkamp R.F., Leyssens L., Vanderzande D., Gelan J., Raus J. (1998 a) In vitro models are important tools to monitor the abuse of anabolic steroids in cattle. *Analyst*, 123: 2453-2456

Vincenti M., Girolami F., Capra P., Pazza M., Carletti M., Gardini G., Nebbia C. (2009) Study of Dexamethasone urinary excretion profile in cattle by LC-MS/MS: comparison between therapeutic and growth-promoting administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1299-1306

Vree T.B., Lagerwerf A.J., Verwey-Van Wissen C.P.W.G.M., Jongen P.J.H. (1998) High-performance liquid chromatography analysis, preliminary pharmacokinetics, metabolism and renal excretion of methylprednisolone with its C6 and C20 hydroxy metabolites in multiple sclerosis patients receiving high-dose pulse therapy. *Journal of Chromatography B*, 732: 337-348

[http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc\\_2007\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf)

## RIFERIMENTI NORMATIVI

**Regolamento (CEE) n. 2377/90** del Consiglio del 26 giugno 1990 che definisce una procedura comunitaria per la determinazione dei limiti massimi di residui di medicinali veterinari negli alimenti di origine animale.

**Direttiva 96/22/CE** del Consiglio del 29 aprile 1996 concernente il divieto d'utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze  $\beta$ -agoniste nelle produzioni animali e che abroga le Direttive 81/602/CEE, 88/146/CEE e 88/299/CEE.

**Direttiva 96/23/CE** del Consiglio del 29 aprile 1996 riguardante le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti e che abroga le Direttive 85/358/CEE e le Decisioni 89/187/CEE e 91/664/CEE.

**Decreto Legislativo 4 agosto 1999, n. 336** "Attuazione delle Direttive 96/22/CE e 96/23/CE concernenti il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze (beta)-agoniste nelle produzioni di animali e le misure di controllo su talune sostanze e sui loro residui negli animali vivi e nei loro prodotti".

**Decisione della Commissione 2002/657/CE** che attua la Direttiva 96/23/CE del Consiglio relativa al rendimento dei metodi analitici e all'interpretazione dei risultati.

**Decreto Legislativo 16 marzo 2006, n. 158** "Attuazione della Direttiva 2003/74/CE, concernente il divieto di utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali.

**Direttiva 2008/97/CE** del Parlamento Europeo e del Consiglio del 19 novembre 2008 che modifica la Direttiva 96/22/CE del Consiglio concernente il divieto d'utilizzazione di talune sostanze ad azione ormonica, tireostatica e delle sostanze beta-agoniste nelle produzioni animali.

**Regolamento (CE) n. 470/2009** del Parlamento Europeo e del Consiglio del 6 maggio 2009 che stabilisce procedure comunitarie per la determinazione di limiti di residui di sostanze farmacologicamente attive negli alimenti di origine animale, abroga il Regolamento (CEE) n. 2377/90 del Consiglio e modifica la Direttiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio e il regolamento (CE) n. 726/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio.

### **SITI INTERNET CONSULTATI**

[http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc\\_2007\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fodd/chemicalsafety/residues/workdoc_2007_en.pdf)

<http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/087403en.pdf>.